

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 702 617**

21 Número de solicitud: 201731065

51 Int. Cl.:

C07K 1/12	(2006.01)
C07K 7/06	(2006.01)
A61K 38/08	(2006.01)
A61P 3/08	(2006.01)
A61P 3/10	(2006.01)
A61P 19/02	(2006.01)
A61P 19/10	(2006.01)
A61K 38/01	(2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

04.09.2017

43 Fecha de publicación de la solicitud:

04.03.2019

71 Solicitantes:

**UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI (100.0%)
C/ Escorxador s/n
43003 Tarragona ES**

72 Inventor/es:

**BRAVO VÁZQUEZ, Francisca Isabel;
PINENT ARMENGOL, Montserrat;
CASANOVA MARTÍ, Angela;
MARGALEF JORNET, María;
ARDÈVOL GRAU, Anna;
SERRANO LÓPEZ, Joan Josep;
AROLA FERRER, Lluís y
MUGUERZA MARQUÍNEZ, Begoña**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario;

Observaciones:

La lista de secuencias está accesible al público en la página web de la OEPM para su descarga en formato electrónico.

54 Título: **Hidrolizados de garras de patas de pollo, sus péptidos y usos de los mismos**

57 Resumen:

Hidrolizados de garras de patas de pollo, sus péptidos y usos de los mismos.

La presente invención pertenece al campo de los hidrolizados de proteínas. En concreto, se refiere a hidrolizados de garras de patas de pollo y a los péptidos que comprende. Asimismo, se refiere al uso de dichos hidrolizados y/o péptidos en el tratamiento y/o prevención de una condición en la que el sistema incretina está alterado.

ES 2 702 617 A1

DESCRIPCIÓN

Hidrolizados de garras de patas de pollo, sus péptidos y usos de los mismos

5 **Campo de la invención**

La presente invención pertenece al campo de hidrolizados de proteínas, en concreto se refiere a hidrolizados de garras de patas de pollo (GPP), a los péptidos que comprende y a su uso en terapia, en particular para el tratamiento y/o prevención de una condición en la que el sistema incretina está alterado.

Antecedentes de la invención

La diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) es una de las enfermedades metabólicas de mayor crecimiento a nivel mundial. Este desorden endocrino asociado a la obesidad, se caracteriza por alteraciones en la secreción de insulina y resistencia a la misma. El primer objetivo en el tratamiento de la DMT2 es mantener los niveles de glucosa dentro de los rangos fisiológicos normales. En este sentido, las hormonas incretinas: péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1) y polipéptido inhibidor gástrico (GIP) representan una estrategia útil para la prevención y/o tratamiento de DMT2. GLP-1 y GIP son importantes mediadoras de la homeostasis de la glucosa, siendo las responsables de aproximadamente el 50-70% de la secreción total de insulina posterior a la ingesta de glucosa. La estrategia principal se centra en aumentar los niveles de GLP-1 en lugar de los de GIP, debido a que las células beta de los pacientes con DMT2 tienen una respuesta reducida a la acción de GIP. De acuerdo con esto, la mayoría de las terapias basadas en incretinas se centran en el uso de compuestos análogos de GLP-1, así como en promover la secreción de GLP-1 endógeno o en el uso de inhibidores del enzima dipeptidil peptidasa-4 (DPP-IV). Este enzima se expresa en distintas partes del cuerpo, entre ellas en las células de la pared intestinal y en las células endoteliales, aunque también puede encontrarse de forma soluble en el plasma. La principal acción del enzima DPP-IV es hidrolizar la hormona GLP-1 convirtiéndola en su forma inactiva, una vez esta es secretada en el plasma, teniendo un promedio de vida de 1-2 minutos. Debido a que la enzima DPP-IV es la responsable de la inactivación de más del 80% de la secreción de GLP-1, la inhibición de este enzima representa una alternativa para aumentar los niveles de la GLP-1 activa y así mejorar la homeostasis de la glucosa.

35 Son conocidos en el estado de la técnica péptidos con actividad inhibitoria del enzima DPP-

IV (actividad iDPP-IV) obtenidos en hidrolizados de distintas fuentes proteicas. Por ejemplo, se han descrito dicho péptidos en hidrolizados de leche (WO 2006/068480) y en hidrolizados de huevo (WO 2009/128713) y se ha descrito que dichos péptidos con actividad iDPP-IV tienen al menos una prolina en su secuencia y normalmente dicha prolina está en la posición 2 del extremo N-terminal.

Sorprendentemente, los autores de la presente invención han desarrollado varios hidrolizados de GPP y caracterizado uno de ellos con actividad antihiper glucémica *in vivo*. Dicho hidrolizado comprende péptidos con actividad iDPP-IV que no tienen el patrón típico de los péptidos con dicha actividad, es decir, que carecen de la prolina en la posición 2 del extremo N-terminal.

Existen en el estado de la técnica documentos que describen la secuencia de algunos de los péptidos de la presente invención. Por ejemplo, el documento WO2008/063369 describe un péptido de secuencia LAADDFR y su uso como biomarcador para el diagnóstico de enfermedades neurológicas, como por ejemplo el Alzheimer. Sin embargo, no describe su uso para el tratamiento y/o prevención de una condición en la que el sistema incretina está alterado.

Así, se desea proporcionar nuevos hidrolizados de proteínas que puedan ayudar en la prevención y/o el tratamiento de las condiciones en las que el sistema incretina está alterado.

Objeto de la invención

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un hidrolizado de proteínas que tiene actividad inhibidora del enzima DPP-IV *in vitro*, comprende uno o dos péptido(s) de secuencia seleccionada del grupo formado por SEC ID N° 1 y SEC ID N° 2, y es un hidrolizado de proteínas de GPP.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un medicamento, un suplemento alimenticio o producto alimenticio que comprende un hidrolizado según el primer aspecto de la invención. Asimismo, se refiere a una composición farmacéutica que comprende un hidrolizado según el primer aspecto de la invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a un hidrolizado según el primer aspecto de la invención para su uso en terapia.

5 En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere a un hidrolizado según el primer aspecto de la invención para su uso en el tratamiento y/o prevención de una condición en la que el sistema incretina está alterado.

10 En un quinto aspecto, la presente invención se refiere un método para preparar el hidrolizado del primer aspecto de la invención.

En un sexto aspecto, la presente invención se refiere a un hidrolizado de GPP obtenible por el método según el quinto aspecto de la invención.

15 Otros objetos, características, ventajas y aspectos de la presente solicitud serán evidentes para el experto en la materia a partir de la descripción y las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de las figuras

20 La **Figura 1** es un cromatograma de HPLC en fase reversa a escala semipreparativa del sobrenadante activo que se obtiene tras la centrifugación y ultrafiltración, a través de un membrana de 3.000 Da de tamaño de poro, del “hidrolizado p38” obtenido por hidrólisis enzimática con Neutrase[®], 24h, a 25°C pH 7 a partir de polvo de GPP tratado a 50°C, 1,5 h pH 3, F.1 – F.11 corresponden a las once (11) fracciones recogidas.

25 La **Figura 2A** es un cromatograma de HPLC en fase reversa a escala semipreparativa de la fracción más activa (F.3) que se obtuvo en la primera separación por HPLC del “hidrolizado p38” de polvo de GPP, observado a 214 nm. En concreto, se recogieron cuatro (4) subfracciones de la F.3 (F.3.1-F.3.4).

30 La **Figura 2B** es un cromatograma de HPLC en fase reversa a escala semipreparativa de la fracción más activa (F.3) que se obtuvo en la primera separación por HPLC del “hidrolizado p38” de polvo de GPP, observado a 280 nm. En concreto, se recogieron cuatro (4) subfracciones de la F.3 (F.3.1-F.3.4).

35 La **Figura 3A** es una gráfica que muestra la evolución en el tiempo de la concentración de glucosa plasmática de ratas Wistar hembras alimentadas con dieta standard (STD) tras la administración de 1 mL de agua (■) o con dieta de cafetería (CAF) tras la administración de

1 mL de agua (●) o de 1 mL de “hidrolizado p38” (300 mg de proteína/kg de peso del animal) (▲) durante la prueba de tolerancia a la glucosa. Los datos representan la media \pm ESM para un mínimo de seis-siete (6-7) animales. Diferentes letras indican diferencias significativas (Anova 2 vías, test posthoc Bonferroni).

5

La **Figura 3B** es una gráfica que muestra el área bajo la curva de la respuesta glicémica de ratas Wistar hembras alimentadas con dieta standard (STD) tras la administración de 1 mL de agua (STD+agua) o con dieta de cafetería (CAF) tras la administración de 1 mL de agua (CAF+agua) o de 1 mL de “hidrolizado p38” (300 mg de proteína/kg de peso del animal) (Hp38) (CAF+Hp38) durante la prueba de tolerancia a la glucosa. Los datos representan la media \pm ESM para un mínimo de seis-siete (6-7) animales. Diferentes letras indican diferencias significativas (Anova 1 vía, test posthoc Bonferroni).

La **Figura 4A** es una gráfica que muestra la variación en el tiempo de la concentración de glucosa plasmática de ratas Wistar macho de 7 meses alimentadas con dieta de standard (STD) tras la administración de 1,5 mL de agua (○), de 1,5 mL de “hidrolizado p38” (300 mg de proteína/kg de peso del animal) (▲) o de 1 mL de vildagliptina (1 mg/kg de peso del animal) (□) durante la prueba de tolerancia a la glucosa. Los datos representan la media \pm ESM para seis (6-7) animales. Diferentes letras indican diferencias significativas (Anova 2 vías, test posthoc Bonferroni).

La **Figura 4B** es una gráfica que muestra el área bajo la curva de la respuesta glicémica de ratas Wistar macho de 7 meses alimentadas con dieta de standard (STD) tras la administración de 1,5 mL de agua (STD+agua), de 1,5 mL de “hidrolizado p38” (300 mg de proteína/kg de peso del animal) (STD+Hp38) o de 1 mL de vildagliptina (1 mg/kg de peso del animal) (STD+ Vildagliptin) durante la prueba de tolerancia a la glucosa. Los datos representan la media \pm ESM para seis-siete (6-7) animales. Diferentes letras indican diferencias significativas (Anova 1 vía, test posthoc Bonferroni).

La **Figura 5** es una gráfica que muestra el área bajo la curva de la respuesta glicémica de ratas Wistar hembras sanas alimentadas con dieta standard (STD) tras la administración de 1 mL de agua (STD+agua) o de 1 mL de “hidrolizado p38” (300 mg de proteína/kg de peso del animal) (STD+Hp38) durante la prueba de tolerancia a la glucosa. Los datos representan la media \pm ESM para un mínimo de seis-siete (6-7) animales.

35

La **Figura 6A** es una gráfica que muestra la secreción de GLP-1 activo de células STC-1 tratadas con disolución control (control) o “hidrolizado p38” (5 mg de hidrolizado liofilizado/mL) (Hp38) diluido con la misma disolución control. Los datos representan la media \pm ESM (n=6). *indica diferencias significativas (T-Student).

5

La **Figura 6B** es una gráfica que muestra la secreción de GLP-1 activo de segmentos de tejido de íleon tratados con disolución control (control) o “hidrolizado p38” (15 mg de hidrolizado liofilizado/mL) (Hp38) diluido con la misma disolución control. Los datos representan la media \pm ESM (n=6). * indica diferencias significativas (T-Student).

10

Descripción detallada de la invención

Como se usa en la presente solicitud, las formas en singular “un/uno”, “una” y “el/la” incluyen sus correspondientes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos usados en el presente documento tienen el significado que un experto en la técnica a la que esta invención pertenece entiende habitualmente.

15

Con el fin de facilitar la comprensión y de aclarar el significado de determinados términos en el contexto de la presente invención se aportan las siguientes definiciones y realizaciones particulares y preferentes de las mismas, aplicables a todas las realizaciones de los distintos aspectos de la presente invención:

20

En la presente invención “condición en la que el sistema incretina está alterado”, se refiere a cualquier condición perjudicial para un sujeto en la que el sistema incretina está alterado. El sistema incretina está formado por las hormonas GLP-1 y GIP y el enzima DPP-IV, y en la presente invención la alteración en uno, varios o todos ellos se considera un sistema incretina alterado. En particular, se entiende que el sistema incretina está alterado cuando hay un aumento en la actividad DPP-IV y/o una disminución en los niveles de la(s) hormona(s) GLP-1 y/o GIP activa(s) y/o una disminución en la respuesta a GLP-1 y/o GIP.

30

Ejemplos no limitativos de dichas condiciones son diabetes, más particularmente diabetes mellitus tipo 2, condiciones de menor tolerancia a la glucosa (IGT), condiciones alteradas de glucosa en plasma en ayunas, más particularmente hiperglucemia, acidosis metabólica, cetosis, artritis, esclerosis múltiple, enfermedad de Graves, obesidad, sobrepeso y osteoporosis. Así, en una realización particular la condición en la que el sistema incretina está alterado se selecciona del grupo formado por diabetes, diabetes mellitus tipo 2, IGT,

35

condiciones alteradas de glucosa en plasma en ayunas, hiperglucemia, acidosis metabólica, cetosis, artritis, esclerosis múltiple, enfermedad de Graves, obesidad, sobrepeso, osteoporosis y combinaciones de las mismas. Preferentemente, se selecciona de diabetes mellitus tipo 2, IGT, hiperglucemia, obesidad, sobrepeso y combinaciones de las mismas, y
 5 más preferentemente de diabetes mellitus tipo 2, hiperglucemia, sobrepeso, obesidad y combinaciones de las mismas. La implicación del sistema incretina en estos trastornos está bien descrita en la bibliografía y estos trastornos son por lo tanto el objetivo principal del hidrolizado o péptido según la presente invención.

10 En la presente invención “hiperglucemia” (o hiperglicemia) se refiere a niveles de glucosa en sangre superiores a los considerados estándar para un individuo sano (normoglucemia). En particular, se refiere a una concentración de glucosa en sangre ≥ 110 mg/dl en ayunas. Más particularmente, se refiere a una concentración de glucosa en sangre ≥ 110 mg/dl en ayunas y ≥ 140 mg/dl tras la prueba oral a la glucosa. Esta prueba consistente en la determinación
 15 de la glucosa plasmática 2 horas después de la ingesta de 75 g de glucosa en 300 mL de agua después de una noche de ayuno.

En la presente invención “obesidad” y “sobrepeso” se refieren a una acumulación anormal o excesiva de grasa, superiores a los considerados estándar para un individuo sano, que
 20 puede ser perjudicial para la salud. La definición dada por la OMS para “obesidad” o “sobrepeso”, que es aplicable a la presente invención, indica que una de las maneras de definir la “obesidad” o el “sobrepeso” es mediante la determinación del índice de masa corporal (IMC, peso de una persona dividido entre su altura al cuadrado) considerando “obesidad” cuando el IMC es igual o superior a 30 Kg/m^2 y “sobrepeso” cuando el IMC está
 25 comprendido entre 25 y $29,9 \text{ Kg/m}^2$.

“Sujeto” se refiere a cualquier miembro de la clase Mammalia, incluyendo, sin limitación, seres humanos y primates no humanos tales como chimpancés y otros simios y especies de monos; animales de granja, tales como ganado vacuno, ovejas, cerdos, cabras y caballos;
 30 mamíferos domésticos tales como perros y gatos; animales de laboratorio incluyendo roedores, tales como ratones, ratas y cobayas, y similares. El término no indica una edad o sexo concretos. Por lo tanto, los sujetos adultos y recién nacidos, así como los fetos, sean de sexo masculino o femenino, están destinados a su inclusión dentro del alcance de este término. El sujeto es, preferentemente, un ser humano.

35 “Suplemento (o complemento) alimenticio” se refiere a cualquier componente alimenticio que

proporciona componentes nutritivos y/o funcionales específicos y no proporciona el valor energético completo requerido (es decir, generalmente menos que 2000 o 2500 kcal/día) e incluye suplementos alimenticios en forma de polvo o comprimidos, al igual que productos dietéticos, tales como bebidas dietéticas. También están incluidos ingredientes que se pueden añadir al producto alimenticio antes de su consumo o una preparación que puede ser consumida como tal.

“Producto alimenticio” se refiere a cualquier producto, sólido o líquido, natural o transformado, destinado a ser ingerido por un sujeto. En una realización preferente, el producto alimenticio es un producto alimenticio funcional, que se refiere a cualquier producto, sólido o líquido, natural o transformado, destinado a ser ingerido por un sujeto que, aparte de su papel nutritivo básico desde el punto de vista material y energético, es capaz de proporcionar un beneficio para la salud.

El término "prevención" significa la administración profiláctica del hidrolizado, péptido, medicamento, suplemento alimenticio, producto alimenticio y/o composición farmacéutica a pacientes saludables para evitar el brote de la condición en la que el sistema incretina está alterado. Más aun, el término "prevención" significa la administración profiláctica de dichos hidrolizados, péptidos, etc. a pacientes que están en una pre-etapa de la condición, especialmente diabetes, a ser tratada. En el caso de productos alimenticios funcionales, en la presente invención “prevención” se refiere a la reducción del riesgo de padecer una condición en la que el sistema incretina está alterado.

La presente invención se refiere en un **primer aspecto** a un hidrolizado de proteínas que tiene actividad inhibidora del enzima DDP-IV *in vitro*, comprende uno o dos péptido(s) de secuencia seleccionada del grupo formado por SEC ID N° 1 y SEC ID N° 2, y es un hidrolizado de proteínas de GPP. Este hidrolizado se refiere de aquí en adelante como hidrolizado de la invención o HGPP (de hidrolizado de garras de pata de pollo).

El hidrolizado de la presente invención, tiene además actividad antihiper glucémica *in vivo* (ver Ejemplos 6-8) y actividad secretora de GLP-1 *in vitro* (ver Ejemplo 9). Así, en una realización particular, el primer aspecto de la invención se refiere a un hidrolizado de proteínas que tiene actividad inhibidora del enzima DDP-IV *in vitro*, tiene actividad secretora de GLP-1 *in vitro* y/o actividad antihiper glucémica *in vivo*, comprende uno o dos péptido(s) de secuencia seleccionada del grupo formado por SEC ID N° 1 y SEC ID N° 2, y es un hidrolizado de proteínas de GPP.

En otra realización particular según una cualquiera de las realizaciones anteriores, el HGPP comprende además al menos un péptido seleccionado del grupo formado por péptidos de secuencia SEC ID N° 3-7, preferentemente al menos un péptido de secuencia SEC ID N° 3.

En una realización particular comprende uno, varios o todos de los peptidos seleccionados de SEC ID N° 3-7, más particularmente comprende 1, 2, 3, 4 ó 5 peptidos seleccionados de SEC ID N° 3-7. En una realización preferente, el HGP comprende los péptidos de secuencia SEC ID N° 1 - y/o SEC ID N° 2, y SEC ID N° 3 - SEC ID N° 7.

En otra realización particular según una cualquiera de las realizaciones anteriores, comprende 1, 2 ó 3 peptidos seleccionados de SEC ID N° 8-10. En una realización preferente, el HGPP comprende los péptidos de secuencia SEC ID N° 1 y/o SEC ID N° 2, y SEC ID N° 3 - SEC ID N° 10.

Las secuencias descritas en la presente invención son las siguientes:

SEC ID N°	Secuencia
1	LAADDFR
2	IIAPPER
3	AGFAGDDAPR
4	VLDELTLAR
5	TLSDYNIQK
6	AITVAVK
7	GLGVNEVR
8	FVLQIGSIS
9	AGLQFPVGR
10	VFLENVIR

15

El primer aspecto de la invención se refiere también a los péptidos aislados (referidos de aquí en adelante como péptidos de la presente invención) de secuencia SEC ID N° 1 o SEC ID N° 2, y a una combinación de dichos péptidos. Así, se refiere a un péptido aislado cuya secuencia de aminoácidos se selecciona del grupo formado por SEC ID N° 1 y SEC ID N° 2.

Y también se refiere a una combinación que comprende un péptido de SEC ID N° 1 y un péptido de SEC ID N° 2. Estos péptidos tienen actividad iDDP-IV *in vitro* (ver Ejemplo 5, **Tabla VI**). En una realización preferente, el péptido consiste en la secuencia SEC ID N° 1. En otra realización preferente, el péptido consiste en la secuencia SEC ID N° 2. Como se muestra en la **Tabla VI**, estos péptidos son los que mayor actividad iDDP-IV *in vitro* tienen.

25

En una realización particular según una cualquiera de las realizaciones del párrafo anterior, el péptido aislado de secuencia SEC ID N° 1 o 2, o la combinación de estos está en combinación (i.e. combinado) con 1, 2, 3, 4 ó 5 péptidos seleccionados de las secuencias SEC ID N° 3-7 (preferentemente al menos un péptido de secuencia SEC ID N° 3), y
5 opcionalmente 1, 2 ó 3 péptidos seleccionados de las secuencias SEC ID N° 8-10. Así, en una realización particular el primer aspecto de la invención se refiere a una combinación que comprende un péptido de secuencia SEC ID N° 1 y/o un péptido de secuencias SEC ID N° 2, y 1, 2, 3, 4 ó 5 péptidos seleccionados de SEC ID N° 3-7, preferentemente al menos uno es el péptido de secuencia SEC ID N° 3, y opcionalmente comprende 1, 2 ó 3 péptidos
10 seleccionados de SEC ID N° 8-10. En una realización particular, la combinación comprende un péptido de secuencia SEC ID N° 1 y/o un péptido de secuencia SEC ID N° 2, y los péptidos de secuencia SEC ID N° 3 - SEC ID N° 7. En otra realización particular, la combinación comprende los péptidos de secuencia SEC ID N° 1 y/o SEC ID N° 2, y SEC ID N° 3 - SEC ID N° 10.

15

Como se ha indicado anteriormente, se ha descrito que los péptidos con actividad iDPP-IV tienen al menos una prolina en su secuencia y normalmente dicha prolina está en la posición 2 del extremo N-terminal. Sorprendentemente, los péptidos de la presente invención no tienen dicha prolina en la posición 2 y de hecho, la secuencia SEC ID N° 1 no comprende
20 ninguna prolina. Así, no era esperable que dichos péptidos tuviesen actividad iDPP-IV.

Los ensayos para medir la actividad iDDP-IV *in vitro* son ampliamente conocidos por el experto en la materia. Ejemplos de ensayos que pueden llevarse a cabo para determinarla son los mostrados en los Ejemplos de la presente solicitud. Así, en una realización
25 particular, la actividad iDDP-IV *in vitro* se mide siguiendo el método de Tulipano *et al* (Whey protein as source of dipeptidyl dipeptidase IV (dipeptidyl peptidase 4) inhibitors". 2011. Peptides. 32, 835-838), tal y como se ha llevado a cabo en los ejemplos de la presente invención.

30 En una realización preferente según una cualquiera de las realizaciones anteriores del primer aspecto de la invención, el/los péptido(s) consiste(n) en la(s) secuencia(s) dadas, i.e. SEC ID N° 1-SEC ID N° 10.

Los hidrolizados, péptidos aislados y combinaciones de péptidos de la presente invención
35 pueden incorporarse en alimentos, suplementos alimenticios, y en la elaboración de productos farmacéuticos. Así, en un **segundo aspecto**, la invención se refiere a un

medicamento, un suplemento alimenticio o un producto alimenticio que comprende un HGPP, un péptido aislado y/o una combinación de péptidos según una cualquiera de las realizaciones del primer aspecto de la invención.

5 En una realización preferente, el medicamento, suplemento alimenticio o producto alimenticio comprende un HGPP que comprende un péptido de secuencia SEC ID N° 1 o un péptido de secuencia SEC ID N° 2 o una combinación de dichos péptidos; y opcionalmente comprende 1, 2, 3, 4 ó 5 péptidos seleccionados de SEC ID N° 3-7, siendo preferentemente al menos uno de ellos el péptido de secuencia SEC ID N° 3. En una realización particular
10 según una cualquiera de las realizaciones anteriores, el HGPP comprende además 1, 2 ó 3 péptidos de secuencias SEC ID N° 8-10. Preferentemente el medicamento, suplemento alimenticio o producto alimenticio comprende un HGPP que comprende los péptidos SEC ID N° 1 y/o SEC ID N° 2, y SEC ID N° 3 - SEC ID N° 7, más preferentemente comprende los péptidos SEC ID N° 1 y/o SEC ID N° 2, y SEC ID N° 3 - SEC ID N° 10.

15 En otra realización preferente, el medicamento, suplemento alimenticio o producto alimenticio comprende un péptido de secuencia SEC ID N° 1 o un péptido de secuencia SEC ID N° 2 o una combinación de dichos péptidos; y opcionalmente comprende 1, 2, 3, 4 ó 5 péptidos seleccionados de SEC ID N° 3-7, siendo preferentemente al menos uno de ellos el
20 péptido de secuencia SEC ID N° 3. Es decir, el medicamento, suplemento alimenticio o producto alimenticio comprende un péptido de secuencia SEC ID N° 1 o SEC ID N° 2, o una combinación que comprende los péptidos de secuencia SEC ID N° 1 y de secuencia SEC ID N° 2, y comprende opcionalmente 1, 2, 3, 4 ó 5 péptidos seleccionados de SEC ID N° 3-7, siendo preferentemente al menos uno de ellos el péptido de secuencia SEC ID N° 3.

25 En una realización particular según una cualquiera de las realizaciones anteriores, el medicamento, suplemento alimenticio o producto alimenticio comprende además 1, 2 ó 3 péptidos de secuencias SEC ID N° 8-10. Así, preferentemente el medicamento, suplemento alimenticio o producto alimenticio comprende el péptido SEC ID N° 1 y/o el péptido SEC ID
30 N° 2, y los péptidos SEC ID N° 3 - SEC ID N° 7, más preferentemente comprende el péptido SEC ID N° 1 y/o el péptido SEC ID N° 2, y los péptidos SEC ID N° 3 - SEC ID N° 10.

Asimismo, el segundo aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un HGPP, un péptido aislado y/o una combinación de según una cualquiera
35 de las realizaciones del primer aspecto de la invención, y un excipiente farmacéuticamente aceptable. En una realización preferente, la composición farmacéutica comprende los

hidrolizados, péptidos aislados y combinaciones descritos en los tres párrafos anteriores para el medicamento, suplemento alimenticio y producto alimenticio.

5 Los excipientes farmacéuticamente aceptable son ampliamente conocidos por el experto en la materia, en una realización particular son tales como los descritos en, "*Remington's Pharmaceutical Sciences Handbook*" Mack Pub. Co., N.Y. U.S.A.

10 El medicamento, suplemento alimenticio y la composición farmacéutica pueden formularse en cualquier forma de administración deseada, por ejemplo, como comprimidos, cápsulas, jarabes y similares para administración oral, como soluciones estériles o suspensiones en líquidos aceptables para administración parental.

15 En el producto alimenticio de la invención, el HGPP o péptido aislado o combinación de la invención según el primer aspecto de la invención puede ser en si mismo un producto alimenticio funcional o un ingrediente que puede estar combinado con cualquier ingrediente alimenticio común.

20 Como se ha indicado anteriormente, los péptidos e hidrolizados de la invención tienen actividad iDDP-IV, por lo que los medicamentos, suplementos alimenticios, productos alimenticios, o composiciones farmacéuticas que los comprenden pueden servir para el tratamiento y/o prevención de una condición en la que el sistema incretina está alterado. Así, en un **tercer aspecto**, la presente invención se refiere al uso de un HGPP, péptido aislado y/o una combinación según una cualquiera de las realizaciones del primer aspecto de la invención, para la preparación de un medicamento, un suplemento alimenticio o un producto alimenticio, en particular para la preparación de un medicamento.

30 El tercer aspecto de la invención se refiere también a un HGPP, un péptido aislado y/o una combinación según una cualquiera de las realizaciones del primer aspecto de la invención, para su uso en terapia. Asimismo, se refiere al medicamento, suplemento alimenticio, producto alimenticio, o composición farmacéutica según una cualquiera de las realizaciones del segundo aspecto de la invención, para su uso en terapia.

35 En una realización particular según una cualquiera de las realizaciones según los dos párrafos anteriores, el HGPP comprende el péptido de SEC ID N° 2. Más particularmente, el HGPP comprende el péptido de SEC ID N° 2 y el péptido de SEC ID N° 1. Aún más particularmente, el HGPP comprende además 1, 2, 3, 4 ó 5 peptidos seleccionados de SEC

ID N° 3-7, siendo preferentemente al menos uno de ellos el péptido de secuencia SEC ID N° 3, y opcionalmente comprende además 1, 2 ó 3 péptidos de secuencias SEC ID N° 8-10. Preferentemente, el hidrolizado comprende los péptidos SEC ID N° 1 - SEC ID N° 7, más preferentemente comprende los péptidos SEC ID N° 1 - SEC ID N° 10. En otra realización particular según una cualquiera de las realizaciones según los dos párrafos anteriores, el péptido aislado es el péptido de secuencia SEC ID N° 2 y la combinación de péptidos comprende el péptido de SEC ID N° 2 y el péptido de SEC ID N° 1; y opcionalmente 1, 2, 3, 4 ó 5 péptidos seleccionados de SEC ID N° 3-7, siendo preferentemente al menos uno de ellos el péptido de secuencia SEC ID N° 3. Más particularmente, la combinación comprende además 1, 2 ó 3 péptidos seleccionados de SEC ID N° 8-10. Preferentemente, la combinación comprende los péptidos SEC ID N° 1 - SEC ID N° 7, más preferentemente comprende los péptidos SEC ID N° 1 - SEC ID N° 10.

En un **cuarto aspecto**, la presente invención se refiere al uso de un HGPP, péptido aislado y/o una combinación según una cualquiera de las realizaciones del primer aspecto de la invención, para la preparación de un medicamento, un suplemento alimenticio, o un producto alimenticio para el tratamiento y/o prevención de una condición en la que el sistema incretina está alterado. Más preferentemente, se refiere a su uso para la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o prevención de una condición en la que el sistema incretina está alterado.

El cuarto aspecto de la invención se refiere también a un HGPP, un péptido aislado y/o una combinación según una cualquiera de las realizaciones del primer aspecto de la invención, para su uso en el tratamiento y/o prevención de una condición en la que el sistema incretina está alterado.

Además, el cuarto aspecto de la invención se refiere a un método de tratamiento de una condición en la que el sistema incretina está alterado, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de un HGPP, un péptido aislado y/o una combinación según una cualquiera de las realizaciones del primer aspecto de la invención, o de un medicamento, suplemento alimenticio, producto alimenticio o composición farmacéutica según una cualquiera de las realizaciones descritas en el segundo aspecto de la invención, a un sujeto que lo necesite. En una realización preferente, la administración se lleva a cabo por vía oral. En otra realización preferente, el sujeto es un humano.

Asimismo, el cuarto aspecto de la invención se refiere a un método de prevención de una

condición en la que el sistema incretina está alterado, que comprende la administración de una cantidad profilácticamente efectiva de un HGPP, un péptido aislado y/o una combinación según una cualquiera de las realizaciones del primer aspecto de la invención, o de un medicamento, suplemento alimenticio, producto alimenticio o composición farmacéutica según una cualquiera de las realizaciones descritas en el segundo aspecto de la invención, a un sujeto que lo necesite. En una realización preferente, la administración se lleva a cabo por vía oral. En otra realización preferente, el sujeto es un humano.

En una realización particular según una cualquiera de las realizaciones anteriores según el cuarto aspecto de la invención, el HGPP comprende el péptido de SEC ID N° 1 y/o SEC ID N° 2. Más particularmente, el hidrolizado comprende el péptido de SEC ID N° 1 y el péptido de SEC ID N° 2. En otra realización particular según una cualquiera de las realizaciones anteriores, el hidrolizado comprende además 1, 2, 3, 4 ó 5 peptidos seleccionados de SEC ID N° 3-7, siendo preferentemente al menos uno de ellos el péptido de secuencia SEC ID N° 3, y opcionalmente comprende además 1, 2 ó 3, peptidos seleccionados de SEC ID N° 8-10. Preferentemente comprende los péptidos SEC ID N° 1 y/o SEC ID N° 2, y SEC ID N° 3- SEC ID N° 7, y más preferentemente comprende los péptidos SEC ID N° 1 y/o SEC ID N° 2, y SEC ID N° 3 - SEC ID N° 10.

En una realización particular según uno cualquiera de los párrafos anteriores del cuarto aspecto de la presente invención, la condición en la que el sistema incretina está alterado se selecciona del grupo formado por diabetes, diabetes mellitus tipo 2, IGT, condiciones alteradas de glucosa en plasma en ayunas, hiperglucemia, acidosis metabólica, cetosis, artritis, esclerosis múltiple, enfermedad de Graves, sobrepeso, obesidad, osteoporosis y combinaciones de las mismas. Preferentemente, se selecciona de diabetes mellitus tipo 2, IGT, hiperglucemia, sobrepeso, obesidad y combinaciones de las mismas, y más preferentemente de diabetes mellitus tipo 2, hiperglucemia, sobrepeso, obesidad y combinaciones de las mismas.

La prevención y/o el tratamiento con los HGPP, péptidos y/o una combinación de la presente invención supone una gran ventaja frente a los tratamientos químicos ya que los hidrolizados de proteínas alimentarias son ingredientes alimenticios de origen natural que carecen de toxicidad o tienen una toxicidad mínima.

La posología dependerá de varios factores tales como tipo y gravedad de la condición patológica a ser tratada, peso del paciente y sexo, etc. y será fácilmente determinada por el

experto en la materia. Preferiblemente, los hidrolizados de la invención se administran a una dosis de entre 1 mg y 8 g de proteína por día y por kg del sujeto al que se le administran, preferentemente entre 5 mg y 6 g de proteína por día y por kg. En cuanto a los péptidos aislados, la dosis preferida de administración es de entre 1 mg y 4 g de péptido por kg al día, preferiblemente entre 10 mg y 3 g por kg y por día. Así, en una realización particular, el medicamento, complemento alimenticio, producto alimenticio o composición farmacéutica, comprende el hidrolizado y/o péptido o combinación de la invención en una cantidad tal que permite una administración según las dosis mencionadas en este párrafo. Esta realización es aplicable igualmente al segundo aspecto de la invención.

10

En un **quinto aspecto**, la presente invención se refiere al método para preparar el HGPP según una cualquiera de las realizaciones del primer aspecto de la invención (método de la invención).

15 El método de la presente invención comprende las siguientes etapas:

a) triturar GPP y liofilizar para obtener un material en polvo con tamaño de partícula menor de 2 mm;

b) ajustar una disolución acuosa del polvo anterior a un pH de entre 2-4;

c) calentar a entre 40°C y 120°C, durante entre 10 y 120 min;

20 d) enfriar la disolución anterior a una temperatura de entre 20°C y 55°C;

e) ajustar el pH de la disolución anterior a un pH entre 6,5 y 7,5;

f) añadir un enzima proteolítica seleccionada del grupo que consiste en:

- enzimas proteolíticas de *Bacillus licheniformis* y *Bacillus amyloliquefaciens* identificadas como E.C. 3.4.21.62 y 3.4.24.28,

25 - una serinproteasa de *Bacillus licheniformis* identificada como E.C. 3.4.21.62,

- una metaloproteasa dependiente de Zinc de *Bacillus amyloliquefaciens* identificada como E.C. 3.4.24, y

- una mezcla entre ellas,

y realizar una hidrólisis enzimática durante entre 1 y 24 h; y

30 g) determinar la actividad iDPP-IV *in vitro* y seleccionar un hidrolizado con una actividad iDPP-IV superior al 80%.

En una realización preferida, el polvo de la etapa a) tiene una humedad inferior al 5%.

35 Sorprendentemente, el tratamiento con pH de la etapa b) (referido de aquí en adelante como "pre-tratamiento con pH") y el tratamiento térmico de la etapa c) (referido de aquí en

adelante como “pre-tratamiento térmico”), resultan en un hidrolizado con una actividad iDPP-IV mejorada (ver **Tabla I**). Destacar además que estos pre-tratamientos no son excesivamente costosos y sin embargo resultan en un gran aumento de la actividad iDPP-IV.

5

Así, la combinación de dichas etapas b) y c) provoca una mejoría en la actividad iDPP-IV del hidrolizado obtenido por el método de la presente invención. En una realización preferida según una cualquiera de las realizaciones anteriores, la etapa b) se lleva a cabo a pH 3. En otra realización preferida, la etapa c) se lleva a cabo a 50°C o a 100°C. Más preferentemente, la etapa b) se lleva a cabo a pH 3 y la etapa c) se lleva a cabo a 50°C o a 100°C. En otra realización preferente según una cualquiera de las realizaciones anteriores, la etapa c) se lleva a cabo durante un tiempo de entre 70 y 100 minutos.

10

En otra realización preferente según una cualquiera de las realizaciones anteriores, las etapas c) y/o f) se llevan a cabo en agitación.

15

En otra realización preferente según una cualquiera de las realizaciones anteriores, la temperatura de la etapa d) es de entre 25°C y 50°C.

En otra realización preferente según una cualquiera de las realizaciones anteriores, el pH de la etapa e) es pH 7.

20

En una realización preferente del método de la invención los ajustes de pH se hacen con HCl o NaOH, según corresponda.

25

En otra realización preferida según una cualquiera de las realizaciones anteriores, los enzimas utilizadas en la etapa f) son enzimas proteolíticas de *Bacillus licheniformis* y *Bacillus amyloliquefaciens*, e identificadas como E.C. 3.4.21.62 y 3.4.24.28; o una metaloproteasa dependiente de zinc de *Bacillus amyloliquefaciens* identificada como E.C. 3.4.24. Enzimas comerciales de estos tipos son los siguientes: Protamex® (Novozyme) que en la fecha de la presente solicitud son las enzimas proteolíticas de *Bacillus licheniformis* y *Bacillus amyloliquefaciens* (E.C. 3.4.21.62 y 3.4.24.28) y Neutrased® (Novozyme) que es una metaloproteasa dependiente de Zinc de *Bacillus amyloliquefaciens* (E.C. 3.4.24). Así, en una realización preferida el enzima proteolítico es Protamex® o Neutrased®.

30

35

En otra realización preferida según una cualquiera de las realizaciones anteriores, la

hidrólisis de la etapa f) se lleva a cabo durante entre 2 y 24 h, preferentemente durante 2 ó 24 horas.

5 En una realización preferente según una cualquier de las realizaciones anteriores, el pH de la etapa b) es 3, la etapa c) se lleva a cabo a 100°C y el enzima es Protamex®. Preferentemente, la reacción de hidrólisis se lleva a cabo a pH 7, 50°C durante 2 horas. Tal y como se muestra en la **Tabla I**, estas condiciones resultan en un hidrolizado con una actividad de inhibición de la DPP-IV del 93,30%.

10 En otra realización preferente según una cualquier de las realizaciones anteriores, el pH de la etapa b) es 3, la etapa c) se lleva a cabo a 50°C, y el enzima es Neutrase®. Preferentemente, la reacción de hidrólisis se lleva a cabo a pH 7, 25°C y 24 horas. Tal y como se muestra en la **Tabla I**, estas condiciones resultan en un hidrolizado con una actividad de inhibición de la DPP-IV del 83,22%.

15

En otra realización preferente según una cualquier de las realizaciones anteriores, el pH de la etapa b) es 3, la etapa c) se lleva a cabo a 100°C, y el enzima es Neutrase®. Preferentemente, la reacción de hidrólisis se lleva a cabo a pH 7, 50°C y 24 horas. Tal y como se muestra en la **Tabla I**, estas condiciones resultan en un hidrolizado con una actividad de inhibición de la DPP-IV del 100%.

20

En una realización particular según una cualquiera de las realizaciones anteriores, la etapa g) se lleva a cabo determinando la actividad iDPP-IV *in vitro* según el método descrito en Tulipano et al (2011), y la selección de un hidrolizado con actividad > 80% se hace con el hidrolizado original sin diluir.

25

Así, en una realización preferente según uno cualquiera de los aspectos de la presente invención, se considera que un hidrolizado muestra actividad iDPP-IV *in vitro* cuando se determina la actividad iDPP-IV *in vitro* según el método descrito en Tulipano et al (2011), tal y como se hace en los ejemplos de la invención, y el hidrolizado muestra una actividad > 80%.

30

En una realización particular, el método comprende una etapa h) adicional, en la que el hidrolizado obtenido en la etapa g) se deseca, preferentemente por calor en estufa, horno, liofilizador o atomizador.

35

En una realización particular del método de la invención, el método consiste en las etapas a)-g) tal y como se definen en cualquiera de las realizaciones descritas en los párrafos anteriores. En otra realización particular, el método consiste en las etapas a)-h) tal y como se definen en cualquiera de las realizaciones descritas en los párrafos anteriores.

5

Como se ha indicado anteriormente, la materia prima para preparar el hidrolizado de la invención son las GPP, que son un subproducto de la industria cárnica. Así, el método de producción del hidrolizado de la presente invención es un método barato y fácil de industrializar, que permite utilizar un subproducto industrial normalmente desechado.

10

En un **sexto aspecto**, la presente invención, se refiere también a los hidrolizados de GPP obtenibles por cualquiera de los métodos descritos en los párrafos anteriores del quinto aspecto. Además, se refiere a medicamentos, suplementos alimenticios, productos alimenticios o composiciones farmacéuticas que los comprenden, a su uso en terapia, y a su uso para el tratamiento de una condición en la que el sistema incretina está alterado, tal y como se ha definido en el segundo, tercer y cuarto aspecto de la invención.

15

Dichos hidrolizados obtenibles según los métodos del quinto aspecto de la invención tienen actividad iDPP-IV *in vitro*, actividad antihiper glucémica *in vivo* y son capaces de inducir la secreción de GLP-1.

20

Por último, destacar que se ha descartado que el hidrolizado de la presente invención (según una cualquiera de las realizaciones del primer o sexto aspecto de la invención) presente actividad hipoglucémica mediante un estudio *in vivo* en el que se utilizaron ratas normoglucémicas y a las que se les administró un hidrolizado de la invención, como se muestra en el Ejemplo 8. Esta actividad hipoglucémica no es una actividad deseable ya que es la bajada de la glucosa de un sujeto (persona o animal) sano, mientras que la actividad antihiper glucémica es la disminución de la glucosa en un sujeto con hiper glucemia. Resulta de gran importancia que el hidrolizado de la invención muestre un efecto terapéutico en los sujetos con hiper glucemia y no en los sanos.

25

30

Ejemplos

A continuación se detallan unos ejemplos concretos de realización de la invención que sirven para ilustrar la invención.

35

Ejemplo 1: Procedimiento de obtención de polvo de GPP.

Se lavaron 15 kg de GPP *Gallus gallus domesticus* con agua y se trituraron en una trituradora industrial Cato utilizando una placa de corte de 8 mm. Este triturado se congeló en capas finas (1-1,5 cm) y se liofilizó durante 5 días. El liofilizado se molió con una batidora Fagor modelo BV-850 y el molido obtenido se tamizó con un tamiz de tamaño de poro de 2 mm. Se obtuvo así un polvo fino con tamaño de partícula <2 mm y un contenido de humedad <5 % (polvo de GPP). El polvo de GPP que presentó un porcentaje de humedad superior al indicado se volvió a liofilizar o se dejó secar en una estufa a 50°C durante 15 h. Posteriormente, se guardó a -20°C en botes cerrados y rodeados de sílica gel para evitar un aumento de la humedad de las muestras.

Ejemplo 2. Procedimiento de obtención de hidrolizados a partir del polvo de GPP.

A partir del polvo de GPP se obtuvieron los hidrolizados siguiendo el siguiente proceso, cuyas condiciones se resumen en la **Tabla I**.

Una vez obtenido el polvo de GPP se procedió a un pre-tratamiento con cambios de pH y/o de temperatura según se indica en la **Tabla I**. En tubos de plásticos de fondo redondo se pesaron 0,1 g de polvo de GPP, se les adicionó un volumen de agua destilada, obteniéndose así una disolución con un pH de 7,5 (i.e. pH inicial = 7,5). En aquellos hidrolizados sometidos a pre-tratamiento por pH, se ajustó el pH a 3 con HCl (0,1 M), obteniendo un volumen final de 4 mL. Posteriormente, los tubos se introdujeron en un baño de agua a una temperatura de 25, 50 ó 100°C, y se dejaron en agitación 1,5 h.

Transcurrido este tiempo, las muestras pre-tratadas a 50 ó 100°C se dejaron enfriar y a todas las muestras pre-tratadas se les ajustó el pH a 7 con NaOH 1 M o HCl 0,1 N. Posteriormente, las muestras se introdujeron en una estufa durante 5 min a 25 o 50°C con el fin de que las muestras alcanzaran la temperatura deseada para la hidrólisis y se procedió entonces a realizar la hidrólisis enzimática.

Para llevar a cabo dicha hidrólisis, a las muestras de GPP obtenidas se les añadieron 0,5 mL de una disolución de enzima Neutrase[®] 0,8 L o Protamex[®] (disuelta en agua destilada) a una concentración de enzima/proteína de GPP de 0,4 AU. El volumen final de reacción en todos los casos fue de 5 mL por lo que se ajustaron los volúmenes con agua destilada.

Las hidrólisis se realizaron a 25 ó 50°C en agitación constante a 250 rpm en orbital, durante entre 2 y 24 h, según se indica en la **Tabla I**. Finalizada la hidrólisis, las enzimas se

inactivaron por calor en un baño de agua a 85°C durante 10 min. Las muestras se enfriaron en hielo durante 10 min y se centrifugaron a 10000 x g, 20 min, 4°C. Los sobrenadantes obtenidos son los que en la presente invención se denominan “hidrolizados”, que se filtraron con filtros de 0,45 µm y se congelaron a -20°C hasta su posterior análisis.

5

Tabla I.- Actividad iDPP-IV (%) de los hidrolizados de polvo de GPP obtenidos con Neutrase® y Protamex® (0,4 AU) en diferentes condiciones de hidrólisis y pre-tratamiento.

Hidrolizado	Pre-tratamiento		Hidrólisis a pH 7			Inhibición DPP-IV (%)
	T ^a (°C)	pH	Enzima	T ^a (°C)	t ^o (h)	
p86	25	7,5	No			0
p103	25	7,5	Neutrase®	25	24	48,39
p39	50	7,5	Neutrase®	25	24	44,40
p102	25	3	Neutrase®	25	24	60,48
p38	50	3	Neutrase®	25	24	83,22
p115	25	7,5	Neutrase®	50	24	40,22
p19	100	7,5	Neutrase®	50	24	77,19
p114	25	3	Neutrase®	50	24	55,24
p16	100	3	Neutrase®	50	24	100
p111	25	7,5	Protamex®	50	2	44,05
p70	100	7,5	Protamex®	50	2	60,49
p110	25	3	Protamex®	50	2	53,30
p68	100	3	Protamex®	50	2	93,30

10 Ejemplo 3: Selección de los hidrolizados obtenidos a partir del polvo de GPP de acuerdo a su actividad inhibitoria de la DPP-IV

Los hidrolizados obtenidos según el Ejemplo 2 se seleccionaron según su capacidad de inhibir a la enzima DPP-IV, la cual fue determinada como se describe en el Ejemplo 4.

15 Solamente se seleccionaron los hidrolizados que mostraron un porcentaje de inhibición mayor (>) a 80% (marcados en negrita en la **Tabla I**). A estos hidrolizados se les determinó la cantidad mínima necesaria para inhibir el 50% del enzima DPP-IV (IC₅₀), expresada como µL de hidrolizado o µg de proteína/mL de hidrolizado (**Tabla II**). Todos los hidrolizados tuvieron un IC₅₀ comprendido entre 4 y 4,82 µl de hidrolizado o 270 y 303 µg de proteína/mL

de hidrolizado. No se observaron diferencias significativas entre los IC₅₀, expresados en µg/mL, de los tres hidrolizados estudiados.

5 **Tabla II.** Actividad iDPP-IV representado en IC₅₀ y contenido proteico de los hidrolizados de polvo de GPP con mayores inhibiciones.

Hidrolizados	Actividad iDPP-IV		Contenido en proteína (mg/mL)
	IC ₅₀ (µL)	IC ₅₀ (µg/mL)	
p16	4,42	297,4	6,83
p38	4,82	302,9	6,24
p68	4,45	300,1	6,62

n=6 obtenido de la medida de la actividad de duplicados de cada uno de los hidrolizados

10 Al no haber diferencias significativas en su actividad (expresado como IC₅₀), se seleccionó el hidrolizado “p38” ya que en su elaboración, era el que requería menor temperatura y por lo tanto menor coste desde el punto de vista industrial. Este hidrolizado fue obtenido con Neutrase[®] durante 24 h a 25°C pH 7 con pre-tratamiento previo a la hidrólisis de 50°C durante 1,5 h a pH 3 (IC₅₀ =4,82 µL de hidrolizado o 302,9 µg de proteína/mL de hidrolizado).

15

Ejemplo 4: Medida de la actividad inhibitoria de la DPP-IV de los hidrolizados, fracciones y péptidos

La determinación de la actividad inhibitoria del enzima DPP-IV en los hidrolizados se realizó utilizando el método descrito por Tulipano *et al* (2011).

20

El ensayo se realizó en placas de 96 pocillos. Para lo cual, en los pocillos se introdujeron 15 µL de una disolución de enzima porcina de DPP-IV (Sigma-Aldrich) en tampón de 100 mM Tris HCl pH 8,0 (0,26 mU/pocillo) y 10 µL del hidrolizado a analizar, incubándose durante 10 min a 37°C. Posteriormente, se añadieron 50 µL del sustrato cromogénico Gly-Pro-pNA (concentración final de 0,2mM) (Bachem) y se ajustó el volumen del pocillo a 100 µL con tampón Tris HCl 100 mM, pH 8,0 y la mezcla se incubó durante 30 min a 37°C. La actividad iDPP-IV se midió a 405 nm cada minuto en el periodo de incubación citado. Además, también se realizaron controles positivos (enzima + sustrato) y negativos (hidrolizado + sustrato). La validez del método se verificó ensayando el compuesto diprotina A (Ile-Pro-Ile) que es un conocido inhibidor de esta enzima. El análisis se realizó por triplicado.

30

A partir de los datos de absorbancia, se realizaron curvas de cinética, obteniéndose una pendiente. La inhibición de la DPP-IV expresó como porcentaje y se calculó siguiendo la siguiente fórmula:

$$5 \quad \% \text{ inhibición} = ((A - (B - C)) / A) \times 100$$

A: pendiente obtenida en la incubación de enzima y sustrato

B: pendiente obtenida en la incubación de enzima, sustrato e hidrolizado

C: pendiente obtenida en la incubación del sustrato y el hidrolizado

10

Para la determinación de la actividad iDPP-IV de las fracciones y de los péptidos se siguió el mismo procedimiento anteriormente descrito con algunas variaciones. Se utilizó el sustrato fluorimétrico H-Gly-Pro-AMC (Bachem) a una concentración final en el pocillo de 0,01 mM y la enzima porcina DPP-IV fue suministrada por Millipore. Se registró la actividad DPPIV de las muestras durante 30 min a 37°C en un fluorímetro utilizando una longitud de onda de excitación de 380 nm y una longitud de onda de emisión de 460 nm.

15

La concentración de proteína de los hidrolizados para determinar el valor de IC₅₀ se determinó por el método Kjeldahl (FIL-IDF. "Milk. Determination of nitrogen content (Kjeldahl method). Standard 20B". 1993. Int. Dairy Fed. Bruselas, Bélgica) multiplicando el porcentaje de nitrógeno de la muestra por 6,25. Mientras que la concentración proteica de las fracciones se determinó por el método del ácido bicinconínico (BCA™ Protein Assay Kit, Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante.

20

25 **Ejemplo 5: Aislamiento, identificación y síntesis de péptidos con actividad iDPP-IV**

Se utilizaron equipos de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) analítica y semipreparativa, así como un equipo de espectrometría de masas (MS) en tandem que permitió la secuenciación de los péptidos. Se realizaron las etapas que se mencionan a continuación.

30

5.A. Obtención de la fracción soluble del "hidrolizado p38" de polvo de GPP

Seguendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 2 se obtuvieron 250 mL del hidrolizado proteico denominado "hidrolizado p38", cuyo sobrenadante se centrifugó nuevamente en dispositivos de filtrado (Centriprep, Amicon Inc) con membrana hidrofílica de 3000 Da de tamaño de poro. El permeado (fracción menor de 3000 Da) obtenido se recogió, liofilizó y guardó -20°C hasta su posterior fraccionamiento.

35

5.B Fraccionamiento por HPLC en fase reversa a escala semipreparativa

El HPLC semipreparativo empleado fue de la serie 1260 de Agilent (Agilent Technologies) que consta de una bomba cuaternaria, un controlador de gradiente, un inyector, un detector de diodo array, un colector de fracciones y un software de adquisición y procesado de datos (Agilent OpenLab CDS ChemStation Edition for LC & LC/MS systems A.01.04).

Se disolvió en agua el permeado liofilizado obtenido en el apartado 5A a una concentración de 100 mg de residuo liofilizado/mL y se procedió a la separación de los péptidos por cromatografía en fase reversa utilizando una columna C₁₈ (Europa peptide, 120 A°, 25 x 1,0 mm, 5 µm; Teknokroma). Los disolventes utilizados fueron una mezcla de agua:ácido trifluoroacético (1000:1) y acetonitrilo:ácido trifluoroacético (1000:0,8), disolventes A y B respectivamente, y la elución se realizó a un flujo de 4 mL/min utilizando los siguientes gradientes en el orden de aparición: 0 a 40% del disolvente B en 50 min), 40-90% de B en 3 min, se mantuvo a 90% de B durante 2 min, 90-100% de B en 1 min. El volumen de muestra inyectado fue de 750 µL y la absorbancia del disolvente se monitorizó a 214 nm.

Se recogieron 11 fracciones diferentes (**Figura 1**) denominadas F.1 - F.11 a partir del hidrolizado proteico denominado "hidrolizado p38", las cuales se liofilizaron y se reconstituyeron en agua Milli-Q a diferentes volúmenes. El contenido proteico de estas fracciones reconstituidas se determinó por el método del ácido bicinconínico (BCATM Protein Assay Kit, Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, se diluyeron a una concentración de 0,20 mg/mL (a excepción de la fracción 11 cuyo contenido proteico fue inferior a esta concentración) y se les determinó la actividad iDPP-IV según el protocolo descrito en el Ejemplo 4 (ver **Tabla III**). A la concentración de proteína ensayada, todas las fracciones mostraron una cierta actividad iDPP-IV aunque solamente 4 de ellas, F.1, F.3, F.8 y F.10, mostraron inhibiciones superiores al 80%.

Adicionalmente, a aquellas fracciones con un porcentaje de actividad iDPP-IV superior al 40% se les determinó el IC₅₀ (**Tabla III**), descartando de esta manera la fracción F.6. Los resultados obtenidos mostraron que solamente 2 de las fracciones ensayadas tenían un IC₅₀ inferior a 100 µg/mL (F.1 y F.3), siendo la fracción F.3 la que mostró el menor valor de IC₅₀ (69 µg de proteína/mL frente a 82,96 µg de proteína/mL para F.3 y F.1, respectivamente), lo cual indicó que era la fracción con mayor actividad iDPP-IV. Aunque a la fracción F.11 no se le pudo determinar su IC₅₀ debido a la poca cantidad de fracción recogida y su bajo contenido proteico, fue descartada como fracción con buena actividad iDPP-IV, ya que según los resultados obtenidos, a una concentración de 90 µg de proteína/mL, solamente

mostraba un 32,80% de actividad por lo que para alcanzar una inhibición del 50% necesitaría de una concentración más elevada de proteína, superior a 100 µg de proteína/mL. Este valor es superior al mostrado por las fracciones F.1 y F.3.

- 5 La fracción F.3 correspondió a los péptidos eluidos entre aproximadamente los min 8,5 y 11,8 (**Figura 1**).

Tabla III. Contenido proteico, porcentaje de actividad iDPP-IV e IC₅₀ de las fracciones obtenidas por HPLC en fase inversa a partir del permeado de tamaño <3000 Da obtenido del hidrolizado proteico denominado "hidrolizado p38".

Fracción	Concentración de proteína (mg/mL) en pocillo	Actividad iDPP-IV (%)	IC ₅₀ (µg/mL)
F.1	0,20	91,46 ± 2,03	82,96 ± 4,41
F.2	0,20	44,06 ± 0,35	240,92 ± 35,42
F.3	0,20	81,20 ± 0,10	68,94 ± 3,86
F.4	0,20	42,63 ± 1,45	226,83 ± 33,42
F.5	0,20	44,10 ± 1,18	211,86 ± 68,30
F.6	0,20	32,80 ± 0,00	ND
F.7	0,20	46,17 ± 0,28	245,47 ± 57,70
F.8	0,20	91,46 ± 2,03	167,00 ± 4,86
F.9	0,20	44,06 ± 0,35	311,26 ± 36,02
F.10	0,20	81,20 ± 0,10	208,26 ± 7,12
F.11	0,09	35,78 ± 1,72	ND

n=6 por fracción

ND: No determinado

- 15 La fracción F.3, que fue la fracción con mayor actividad iDPP-IV, se sometió a un segundo fraccionamiento por HPLC en fase inversa a escala semipreparativa utilizando el mismo equipo, columna y disolventes pero eluyendo la muestra con un gradiente lineal de 0-12% del disolvente B en A en 30 minutos y se mantuvo el 12% del disolvente B en A durante 1 min. Para llevar a cabo la separación de los péptidos contenidos en esta fracción, fue necesario reconstituir la misma en agua Milli-Q, obteniendo una disolución de 50 mg de residuo liofilizado/mL. En este caso, el volumen de inyección fue de 250 µL y se monitorizó la absorbancia del disolvente a 214 y 280 nm. Se recogieron 4 subfracciones a partir de la

fracción F.3 (F.3.1, F.3.2, F.3.3 y F.3.4) (**Figura 2**), las cuales se liofilizaron y se mantuvieron a -20°C hasta su posterior análisis.

Con el fin de determinar cuál de las subfracciones recogidas a partir de la fracción F.3 contenía los péptidos con actividad iDPP-IV, a estas subfracciones se les determinó su actividad inhibitoria siguiendo el método ya descrito en el Ejemplo 4 y la concentración de proteína por el método BCA (BCA™ Protein Assay Kit, Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante (ver **Tabla IV**). Para llevar a cabo estos análisis fue necesario reconstituir las fracciones en agua Milli-Q y se diluyeron todas ellas en la misma solución hasta tener una concentración de proteína de 0,1 mg/mL en cada una de ellas. Tres de las cuatro fracciones mostraron inhibiciones superiores al 50% (F.3.2, F.3.3, F.3.4). A estas tres fracciones también se les determinó la concentración necesaria para inhibir el 50% de la enzima. En la **Tabla IV** se muestran los resultados de este análisis y como se puede observar, la fracción F.3.3 fue la que mostró los valores de IC₅₀ más bajos (26,85 µg de proteína/mL). Esta subfracción F.3.3 eluía aproximadamente entre los minutos 11 y 13 (**Figura 2**), utilizando el método de separación descrito anteriormente.

Tabla IV. Contenido proteico, actividad iDPP-IV e IC₅₀ de las subfracciones obtenidas por HPLC semipreparativo en fase inversa a partir de la fracción F.3.

Subfracción	Concentración de proteína (mg/mL)	Actividad iDPP-IV (%)	IC ₅₀ (µg/mL)
F.3.1	0,1	32,44 ± 1,15	ND
F.3.2	0,1	53,05 ± 0,91	97,99
F.3.3	0,1	88,47 ± 0,01	26,85
F.3.4	0,1	59,02 ± 0,25	72,78

n= 6 por fracción

ND: No determinado

5.C. Identificación de péptidos con actividad iDPP-IV por espectrometría de masas en tandem (MS/MS)

Para la identificación de los péptidos responsables de la actividad iDPP-IV de la subfracción F.3.3, obtenida mediante por una doble separación cromatográfica de la fracción <3000 Da del "hidrolizado p38", se utilizó un espectrómetro de masas LTQ Orbitrap Velos

(ThermoFisher Scientific) dotado de una fuente de ionización conectada on-line a un nano-HPLC Easy-II (Proxeon, Thermo Fisher Scientific). Para lo cual, la subfracción F3.3 se reconstituyó en agua Milli-Q y se diluyó con ácido trifluoroacético 0,1% hasta conseguir una concentración de proteína de 0,1 µg/µl. Los péptidos de la subfracción fueron primeramente pasados por una precolumna C18 EASY-Column (2 cm de longitud, I.D 100 µm, 5 µm de tamaño de partícula; Thermo Fisher Scientific) para eliminar las sales que pudiera tener la subfracción y separados en una nano columna C18 de fase inversa (15 cm de longitud, I.D 75 µm, 3 µm de partícula; Nikkyo technos Co. LTD) en la que se inyectaron 10 µL de la fracción diluida. La separación cromatográfica se realizó con un gradiente continuo de fase B (0 min 2%, 2 min 2%, 42 min 20%, 72 min 32%, 82 min 50%, 92 min 95%, 102 min 95%, 103 min 2%) usando agua como fases móviles agua milli Q conteniendo un 0,1% ácido fórmico (fase A) y acetonitrilo conteniendo un 0,1% ácido fórmico (fase B) y a un flujo de 300 nL/min.

15 Todos los espectros de masas se adquirieron en modo ion positivo. El scan (m/z 50-2000) se adquirió con un valor dirigido de 1000000 en una resolución de 30000 a 400 m/z y los 10 iones más intensos se seleccionaron para fragmentación de disociación inducida por colisión en el LTQ con un valor dirigido de 10000 y una energía de colisión de 35%.

20 La identificación de las proteínas/péptidos se realizó en el programa Proteome Discoverer v.1.4.0.288 (Thermo Fisher). Todos los espectros MS y MS/MS se analizaron utilizando el motor de búsqueda Mascot (v.2.5). Mascot fue programado para buscar en la base de datos Gallus_20170224.fasta (2281 entradas) perteneciente a la base de datos Swiss-Prot y suponiendo que no había digestión enzimática. Se permitió un error de 0,8 Da para masa de 25 iones de fragmentos de IT-MS/MS y 10,0 ppm para una masa de iones primarios de FT-MS. La oxidación de la metionina se estableció como modificaciones dinámicas y la tasa de descubrimiento falso (FDR) y las probabilidades de la proteína fueron calculadas por Perclorator. Sólo se consideraron péptidos con una puntuación de Mascot superior a 20 y un ΔC_n menor de 0,05. Para la cuantificación relativa del péptido, se utilizó el área del ión precursor del péptido. Se identificaron los péptidos que se recogen en la **Tabla V**.

30

Tabla V. Péptidos identificados en la subfracción F.3.3

SEQ. ID. N°:	N° aminoácidos	Masa Teórica	Masa experimental
1	7	806,88	806,39
2	7	794,96	794,47
3	10	976,02	975,44
4	9	1029,21	1029,59
5	9	1081,20	1081,51
6	7	700,88	700,45
7	8	842,96	842,46
8	9	963,15	963,55
9	9	944,11	944,53
10	8	989,19	988,57

5.D Síntesis de los péptidos con actividad iDPP-IV

- 5 Los péptidos de la invención se enviaron a sintetizar químicamente a Caslo ApS (Lyngby, Dinamarca) y se obtuvieron preparados con los valores de pureza mostrados en la **Tabla VI**.

Una vez sintetizados se les determinó su actividad iDPP-IV con el fin de conocer cuál o cuáles de los péptidos identificados en la subfracción F.3.3 eran el o los responsables de dicha actividad en la fracción. Para ello, los péptidos fueron reconstituidos en agua Milli-Q (SEC ID N°: 1, 2, 3, 5, 6, 7 y 9) o en 1 % DMSO (SEQ. ID.N°: 4, 8 y 10) dependiendo de su solubilidad. La actividad iDPP-IV de los péptidos se determinó según el protocolo descrito en el Ejemplo 4. En la **Tabla VI** se muestran los porcentajes de inhibición mostrados por los diferentes péptidos identificados en la subfracción F.3.3 a una concentración de 500 μ M. A la concentración ensayada, pocos péptidos pudieron inhibir a la enzima, solamente tres de ellos mostraron una inhibición superior del 10% (SEC ID N°: 1, 2 y 3). Claramente, la SEC ID N° 1 fue la que mostró la más elevada inhibición con un 41,91% a una concentración de 500 μ M, siendo su IC₅₀ de 818,04 μ M. El IC₅₀ de los péptidos SEC ID N° 2 y 3, que también mostraron una cierta actividad iDPP-IV, no se pudieron determinar debido a la baja solubilidad de los mismos a concentraciones altas. Sin embargo, los resultados obtenidos indican que su IC₅₀ es superior a 2 mM ya que a esta concentración, estos péptidos, mostraron porcentajes de inhibición de 41 y 49 (SEC ID N° 2 y 3, respectivamente).

Tabla VI. Caracterización de los péptidos identificados de la subfracción F.3.3

Péptido SEC ID N°	Pureza (%)	Actividad iDPP-IV (%)	IC₅₀ (µM)
1	99,03	41,91	818,04
2	99,41	17,99	>2000
3	95,91	11,88	>2000
4	98,74	3,42	ND
5	99,62	1,95	ND
6	98,98	4,10	ND
7	95,48	6,89	ND
8	97,54	0,00	ND
9	95,26	0,00	ND
10	95,73	0,00	ND

n= 6 por péptido

ND: No determinado

5

Ejemplo 6: Determinación del efecto antihiper glucémico del “hidrolizado p38” de polvo de GPP en ratas con intolerancia a la glucosa inducida por la dieta.

Para evaluar el efecto antihiper glucémico del hidrolizado seleccionado, “hidrolizado p38”, se hizo un estudio agudo, con animales que presentaban intolerancia a la glucosa inducido por la dieta mediante la realización de un test de tolerancia a la misma posterior a la administración del “hidrolizado p38”.

El modelo animal utilizado fueron ratas Wistar (Harlan, Barcelona, España) hembras obesas de 20 semanas. Los animales utilizados en el estudio se estabularon individualmente, con libre acceso a comida y agua, y con unas condiciones de temperatura de 22°C y unos ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. El desarrollo de la obesidad se debió a una alimentación con dieta cafetería (CAF) compuesta por zanahoria, beicon y leche con azúcar y además con pienso estándar durante 10 semanas. Después de estas 10 semanas, los animales se dividieron en dos grupos: el grupo control, el cual fue tratado con agua, y el grupo tratado con hidrolizado. El día del experimento a las nueve de la mañana, los tratamientos se administraron a los animales con sonda intragástrica (ayunados desde la noche anterior). Las dosis administradas fueron 1 mL de agua o 1 mL de hidrolizado (300 mg de proteína/kg de peso del animal disuelto en agua). Después de 40 minutos, se extrajo sangre de la cola (extracción a tiempo 0) y seguidamente se les administró una dosis de

glucosa (2 g/kg de peso del animal), también con sonda intragástrica. Posteriormente, se extrajeron muestras de sangre de la cola a los 15, 30, 60 y 120 minutos después de la administración de la dosis de glucosa. Las muestras de sangre fueron rápidamente centrifugadas (2500 x g, 4°C, 15 min) para separar el plasma, el cual se guardó a -80°C hasta su posterior análisis.

Previo al desarrollo de la obesidad y de la intolerancia a la glucosa inducida por la dieta en estos animales. A estos animales, alimentados con dieta estándar (STD) consistente en pienso y agua *ad libitum*, se les realizó también un test de tolerancia a la glucosa, como se ha descrito previamente, después de haberles administrado 1 mL de agua o 1 mL de hidrolizado (300 mg de proteína/kg de peso del animal disuelto en agua). Se les recogió también sangre de la cola en las mismas condiciones descritas previamente.

El procedimiento utilizado en el estudio fue aprobado por el Comité Ético de la Universitat Rovira i Virgili.

El efecto antihiper glucémico del “hidrolizado p38” se evaluó cuantificando los niveles de glucosa plasmáticos de los animales tratados con el hidrolizado comparando con los no tratados. Las concentraciones de glucosa fueron determinadas utilizando el kit de colorimetría enzimática (método de Glucosa oxidasa-Peroxidasa de QCA). Los resultados obtenidos se agruparon y se representaron como concentración de glucosa plasmática en los diferentes tiempos de estudio (media \pm el error estándar de la media (ESM) para un mínimo de 6-7 ensayos homogéneos).

Las cinéticas de los diferentes grupos de animales se compararon en un análisis de la varianza de 2 vías (ANOVA) utilizando el test de Bonferroni y se consideró significativa la diferencia para valores de $p < 0,05$. Además, los resultados también se representaron mediante el cálculo del área bajo la curva descrita anteriormente. Se realizó un análisis de varianza de 1 vía (ANOVA) utilizando el test de Bonferroni a la media de las áreas con el fin de comprobar si existían diferencias significativas entre grupos. Para todos los análisis estadísticos se utilizó el programa estadístico SPSS (IBM SPSS Statistics software versión 20.0).

La **Figura 3 A** muestra los niveles de glucosa plasmática observado en ratas sanas alimentadas con dieta estándar (STD) y tratadas con agua y en ratas obesas alimentadas con dieta de cafetería (CAF) y tratadas con agua o con el “hidrolizado p38”, después de la

ingesta de una dosis de 2 g/kg de peso del animal de glucosa (test de tolerancia a la glucosa). A los 15 min de la ingesta de glucosa se observó un incremento de los niveles plasmáticos de este azúcar en todos los casos, siendo el más elevado el obtenido en las ratas CAF tratadas con agua. El tratamiento con el “hidrolizado p38” en las ratas CAF redujo este pico de glucosa, siendo estadísticamente más bajo que el observado en las ratas cafeteras tratadas con agua y similar al mostrado por las ratas STD. A medida que transcurrió el tiempo de post-administración, los niveles de glucosa plasmáticos fueron disminuyendo en las ratas STD hasta recobrar los valores iniciales, mientras que en las CAF tratadas con agua no se recobraron los valores originales (intolerancia a la glucosa). En el caso de las ratas CAF tratadas con el “hidrolizado p38”, los niveles de glucosa entre los 30 y 120 min no mostraron diferencias significativas con los niveles de glucosa observado en las ratas STD.

La **Figura 3 B** muestra el área debajo de la curva calculado a partir de la curva elaborada con los niveles de glucosa en plasma obtenidos durante la realización del test de tolerancia a la glucosa en ratas hembras STD tratadas con agua o CAF tratadas con agua o el “hidrolizado p38”. Así, el área de glucosa bajo la curva observada fue significativamente menor en los animales CAF tratados con el “hidrolizado p38” que en el grupo CAF tratado con agua, no observándose diferencias significativas con el área obtenido por las ratas STD tratadas con agua.

Por lo tanto en el modelo animal de intolerancia a la glucosa inducida por la dieta, el “hidrolizado p38” produjo una disminución del pico de glucosa plasmática y tendió a normalizar los valores de glucosa, demostrando su efecto antihiper glucémico.

25

Ejemplo 7: Determinación del efecto antihiper glucémico del “hidrolizado p38” de polvo de GPP en ratas con intolerancia a la glucosa inducida por la edad.

El posible efecto antihiper glucémico del “hidrolizado p38” también se probó en otro modelo animal con intolerancia a la glucosa, en este caso, inducida por la edad.

30

Se utilizaron ratas Wistar macho (Harlan) de 7 meses (30 semanas) de edad g, que fueron alimentados con dieta estándar (STD) a base de pienso estándar y agua *ad libitum*. Las condiciones de estabulamiento fueron similares a las descritas en el Ejemplo 6. Los animales se dividieron en tres grupos y se trataron con 1,5 mL de agua, 1,5 mL de hidrolizado (300 mg de proteína/kg de peso del animal disuelto en agua) o 1 mL de vildagliptina (1 mg/mL de agua, inhibidor comercial de DPP-IV, como control positivo)

35

administrados de forma aguda mediante sonda intragástrica. Posteriormente, se les realizó un test de tolerancia a la glucosa y se recogió sangre a diferentes tiempos. La metodología utilizada se describe en el Ejemplo 6. Los resultados obtenidos se agruparon y se representaron como concentración de glucosa plasmática en los diferentes tiempos de estudio (media \pm ESM para un mínimo de 6-7 ensayos homogéneos).

Las cinéticas de los diferentes grupos de animales se compararon en un análisis de la varianza de 2 vías (ANOVA) utilizando el test de Bonferroni y se consideró significativa la diferencia para valores de $p < 0,05$. Además, los resultados también se representaron mediante el cálculo del área bajo la curva descrita anteriormente. Se realizó un análisis de varianza de 1 vía (ANOVA) utilizando el test de Bonferroni a la media de las áreas con el fin de comprobar si existían diferencias significativas entre grupos. Para todos los análisis estadísticos se utilizó el programa estadístico SPSS (IBM SPSS Statistics software versión 20.0).

La **Figura 4A** muestra las curvas y la **Figura 4 B** el área de las curvas obtenidas al analizar los niveles de glucosa plasmática de ratas macho de edad elevada tratadas con agua, “hidrolizado p38” o vildagliptina. Como era de esperar, las ratas tratadas con agua mostraron ser intolerantes a la glucosa al no disminuir los niveles de glucosa después de 120 min de post-administración. Sin embargo, las ratas tratadas con vildagliptina, revertieron este efecto.

Los resultados muestran que en este modelo animal de intolerancia a la glucosa inducida por la edad, el tratamiento con el hidrolizado tendió a disminuir la curva plasmática de glucosa, normalizando los niveles de glucosa plasmática a los 120 min después de la ingestión de este azúcar por lo que se demuestra su efecto antihiper glucémico en este modelo animal.

Ejemplo 8: Determinación del posible efecto antihiper glucémico del “hidrolizado p38” de polvo de GPP en ratas sanas.

Con el fin de descartar si el hidrolizado presentaba efecto antihiper glucémico en ratas sanas se utilizaron ratas Wistar hembras de 8 semanas alimentadas con dieta estándar (STD) y a las cuáles se les administró por sonda intragástrica 1 mL de agua o 1 mL de “hidrolizado p38” (300 mg de proteína/kg de peso del animal disuelto en agua). Posteriormente, a estos animales se les realizó un test de tolerancia a la glucosa y se midió el contenido de glucosa plasmática. La metodología utilizada en ambos casos se describe en el Ejemplo 6. Los

resultados obtenidos se agruparon y se representaron como concentración de glucosa plasmática en los diferentes tiempos de estudio (media \pm el error estándar de la media (ESM) para un mínimo de 6-7 ensayos homogéneos). Se representó la curva obtenida y se cuantificó el área debajo de la curva. Se realizó un análisis Test Student a la media de las áreas con el fin de comprobar si existían diferencias significativas entre grupos mediante el programa estadístico SPSS (IBM SPSS Statistics software versión 20.0).

En la **Figura 5** se muestra el área bajo la curva de glucosa obtenida a partir del contenido de glucosa plasmática durante el test de tolerancia a este azúcar, en ratas hembra sanas tratadas con agua o el “hidrolizado p38”. El área obtenida por ambos tratamientos fue similar, no observándose diferencias significativas entre ellos. Este resultado indica que la administración del “hidrolizado p38” no tiene efecto en los niveles de glucosa plasmáticos inducidos por la realización de un test de tolerancia a la glucosa.

15 **Ejemplo 9: Medida de la capacidad de inducir secreción de GLP-1**

Con el fin de elucidar los mecanismos por los cuales el “hidrolizado p38” tiene efecto antihiper glucémico en ratas con intolerancia a la glucosa, adicionalmente a su efecto inhibidor del enzima DPP-IV demostrado *in vitro* (Tablas I y II), se evaluó la capacidad de secreción de GLP-1 por el “hidrolizado p38” mediante dos estudios uno *in vitro* y otro *ex vivo*.

9.1.- Estudio *in vitro*

La línea celular utilizada fue la STC-1, suministrada por el Dr. B. Wice (Universidad de Washington, St. Louis) con el permiso del Dr. D. Hanahan (Universidad de California, San Francisco). Esta línea celular es enteroendocrina procedente de tumor de ratón transgénico (Rindi et al, "Development of Neuroendocrine Tumors in the Gastrointestinal Tract of Transgenic Mice". 1990. American Journal of pathology. Vol. 136, No 6). Las células se cultivaron con DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) que contenía GlutaMAX™ y 4.5 g/L D-glucosa, sin piruvato sódico (Gibco®), suplementado con 17,5% de suero bovino fetal, 100 U/ml penicilina y 100 mg/ml de estreptomycin (BioWhittaker). Las células se incubaron a 37°C a 5% de CO₂ con una atmósfera humidificada.

Para los estudios de secreción, las células se cultivaron en placas de 24 pocillos a una densidad de $2,0 \times 10^5$ células/pocillo. Después de dos días de crecimiento (densidad de 80-90% de confluencia) se realizó el estudio de secreción. Las células se lavaron dos veces con tampón HEPES (20 mM HEPES, 140 mM NaCl, 4,5 mM KCl, 1,2 mM CaCl₂, and 1,2

mM MgCl₂, pH 7,4). Posteriormente, se añadió el “hidrolizado p38” en los pocillos a una concentración final de 5 mg del hidrolizado liofilizado/mL, disuelto en tampón HEPES con 10 mM de glucosa y se incubaron durante dos (2) horas a 37°C a 5% de CO₂ con una atmósfera humidificada. Como control negativo se utilizó HEPES con 10 mM de glucosa.

5 Después de la incubación, se recogieron los sobrenadantes, los cuales se centrifugaron (1000 x g) para eliminar los restos celulares y se guardaron a -80°C hasta que se analizaron. También se recogieron las células, que fueron reconstituidas en tampón de lisis para extraer la proteína total de las mismas. La determinación del contenido proteico se realizó utilizando el método de BCA (BCATM Protein Assay Kit, Thermo Scientific) siguiendo

10 las instrucciones del fabricante. Se analizaron tres replicados procedentes de diferentes pases celulares, incluyendo tres pocillos por condición en cada replicado. Todos los estudios se hicieron entre los pases 30 y 50.

A todos los sobrenadantes obtenidos se les determinó la concentración de GLP-1 activo con el kit ELISA GLP-1 activo (Millipore) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los niveles

15 de concentración de GLP-1 activo se normalizaron con la concentración de proteína total obtenida de la lisis de las células.

La **Figura 6A** muestra los niveles de GLP-1 activo secretado por las células STC-1 tras su

20 exposición durante 2 horas a HEPES con 10 mM de glucosa (control) o al “hidrolizado p38” disuelto en HEPES con 10 mM de glucosa. El tratamiento con el “hidrolizado p38” produjo un aumento significativo de la secreción de GLP-1 activo, siendo siete veces superior al contenido de GLP-1 secretado por las células tratadas con la solución control.

25 9.2.- Estudio *ex vivo*

Se utilizaron segmentos de íleon distal procedentes de ratas Wistar hembras. Para la obtención de los segmentos, se hizo una incisión en la unión ileocecal y desde esa unión se extrajo 8 cm de la parte distal del íleon. Este segmento se cortó en 6 partes de 0,75 cm² en tampón HBSS (Hank’s balanced salt solution, Termofisher) frío. Estos segmentos de íleon se

30 pusieron individualmente en placas de 24 pocillos y se incubaron durante una hora a 37°C y 5% CO₂ con una disolución de KRBS pH 7,4 (la cual contenía 5 mmol/L KCl, 138 mmol/L NaCl, 4,2 mmol/L NaHCO₃, 1,2 mmol/L NaH₂PO₄, 2,6 mmol/L CaCl₂, 1,2 mmol/L MgCl₂ y 10 mmol/L HEPES) enriquecida con 10 mM de glucosa y 0,1 mM diprotina A, inhibidor de DPP-IV, (control) o con la misma disolución (KRBS + glucosa + diprotina A) pero suplementada

35 con el “hidrolizado p38” (concentración final de 15 mg de hidrolizado liofilizado/mL).

Después de la incubación, se recogieron los sobrenadantes, se centrifugaron (1000 x g) para eliminar los restos celulares y se guardaron a -80°C hasta su análisis. A los sobrenadantes obtenidos se les determinó la concentración de GLP-1 activo con el kit ELISA GLP-1 activo (Millipore) siguiendo las instrucciones del fabricante. La normalización de los resultados se realizó teniendo en cuenta los miligramos del segmento de íleon de cada pocillo.

La **Figura 6B** muestra los niveles de GLP-1 activo secretado por los segmentos de íleon tras su exposición durante 1 hora al “hidrolizado p38” y a la disolución control, en un medio que contenía un inhibidor de DPP-IV para asegurar que los efectos observados son sobre la secreción de la hormona y no por modulación de dicha enzima. El tratamiento con el “hidrolizado p38” estimuló a las células del íleon para secretar GLP-1 activo, aumentando significativamente los niveles de GLP-1 activo en comparación con los niveles inducidos por la disolución control.

15

REIVINDICACIONES

- 1.- Un péptido aislado de secuencia SEC ID N° 1 o SEC ID N° 2, para su uso en el tratamiento y/o prevención de una condición en la que el sistema incretina está alterado.
- 5
- 2.- El péptido para su uso según la reivindicación anterior, donde la condición en la que el sistema incretina está alterado se selecciona del grupo formado por diabetes, diabetes mellitus tipo 2, IGT, condiciones alteradas de glucosa en plasma en ayunas, hiperglucemia, acidosis metabólica, cetosis, artritis, esclerosis múltiple, enfermedad de Graves, sobrepeso, obesidad, osteoporosis y combinaciones de las mismas.
- 10
- 3.- Un péptido aislado de secuencia SEC ID N° 2, para su uso en terapia.
- 4.- Una combinación que comprende un péptido de secuencia SEC ID N° 1 y un péptido de secuencia SEC ID N° 2, para su uso en el tratamiento y/o prevención de una condición en la que el sistema incretina está alterado.
- 15
- 5.- Una combinación que comprende un péptido de secuencia SEC ID N° 1 y/o un péptido de secuencia SEC ID N° 2, y uno, dos, tres, cuatro o cinco péptidos cuya secuencia se selecciona del grupo formado por SEC ID N° 3-7, para su uso en el tratamiento y/o prevención de una condición en la que el sistema incretina está alterado.
- 20
- 6.- La combinación para su uso según la reivindicación 4 ó 5, que comprende además uno, dos o tres péptidos cuya secuencia se selecciona del grupo formado por SEC ID N° 8-10.
- 25
- 7.- La combinación para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 4-6, donde la condición en la que el sistema incretina está alterado se selecciona del grupo formado por diabetes, diabetes mellitus tipo 2, IGT, condiciones alteradas de glucosa en plasma en ayunas, hiperglucemia, acidosis metabólica, cetosis, artritis, esclerosis múltiple, enfermedad de Graves, sobrepeso, obesidad, osteoporosis y combinaciones de las mismas.
- 30
- 8.- Una combinación que comprende un péptido de secuencia SEC ID N° 2 y un péptido de secuencia SEC ID N° 1, para su uso en terapia.
- 35
- 9.- Una combinación que comprende un péptido de secuencia SEC ID N° 2 y uno, dos, tres, cuatro o cinco péptidos cuya secuencia se selecciona del grupo formado por SEC ID N° 3-7,

y opcionalmente un péptido de secuencia SEC ID N° 1, para su uso en terapia.

10.- La combinación para su uso según la reivindicación 8 ó 9, que comprende además uno, dos o tres péptidos cuya secuencia se selecciona del grupo formado por SEC ID N° 8-10.

5

11.- Un hidrolizado de proteínas caracterizado porque tiene actividad inhibidora del enzima DPP-IV *in vitro*, comprende uno o dos péptido(s) de secuencia seleccionada del grupo formado por SEC ID N° 1 y SEC ID N° 2, y es un hidrolizado de proteínas de garras de patas de pollo.

10

12.- El hidrolizado según la reivindicación anterior, que además comprende uno, dos, tres, cuatro o cinco péptidos cuya secuencia se selecciona del grupo formado por SEC ID N° 3-7.

15

13.- El hidrolizado según la reivindicación 11 ó 12, que además comprende uno, dos o tres péptidos cuya secuencia se selecciona del grupo formado por SEC ID N° 8-10.

14.- El hidrolizado según una cualquiera de las reivindicaciones 11-13, que comprende un péptido de secuencia SEC ID N° 2.

20

15.- El hidrolizado según la reivindicación anterior, que además comprende un péptido de secuencia SEC ID N° 1.

16.- Un hidrolizado según una cualquiera de las reivindicaciones 11-15, para su uso en terapia.

25

17.- Un hidrolizado según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15, para su uso en el tratamiento y/o prevención de una condición en la que el sistema incretina está alterado.

30

18.- El hidrolizado para su uso según la reivindicación anterior, donde la condición en la que el sistema incretina está alterado se selecciona del grupo formado por diabetes, diabetes mellitus tipo 2, IGT, condiciones alteradas de glucosa en plasma en ayunas, hiperglucemia, acidosis metabólica, cetosis, artritis, esclerosis múltiple, enfermedad de Graves, sobrepeso, obesidad, osteoporosis y combinaciones de las mismas.

35

19.- Un medicamento, suplemento alimenticio o producto alimenticio caracterizado porque comprende un hidrolizado según una cualquiera de las reivindicaciones 11-15 y/o un péptido

según se ha definido en la reivindicación 1 o una combinación según se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 4-6, 8-10.

5 20.- Una composición farmacéutica caracterizada porque comprende un hidrolizado según una cualquiera de las reivindicaciones 11-15 y/o un péptido según se ha definido en la reivindicación 1 o una combinación según se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 4-6, 8-10, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

10 21.- Un método para preparar un hidrolizado según una cualquiera de las reivindicaciones 11-15, caracterizado porque comprende las siguientes etapas:

- a) triturar garras de pata de pollo y liofilizar para obtener un material en polvo con tamaño de partícula menor de 2 mm;
- b) ajustar una disolución acuosa del polvo anterior a un pH de 2-4;
- c) calentar a una temperatura entre 40°C y 120°C, durante entre 10 y 120 min;
- 15 d) enfriar la disolución anterior a una temperatura entre 20 y 55°C;
- e) ajustar el pH de la disolución anterior a un pH de entre 6,5-7,5;
- f) añadir un enzima proteolítica seleccionada del grupo que consiste en:
 - enzimas proteolíticas de *Bacillus licheniformis* y *Bacillus amyloliquefaciens* identificadas como E.C. 3.4.21.62 y 3.4.24.28,
 - 20 - una serinproteasa de *Bacillus licheniformis* identificada como E.C. 3.4.21.62,
 - una metaloproteasa dependiente de Zinc de *Bacillus amyloliquefaciens* identificada como E.C. 3.4.24, y
 - una mezcla entre ellas,

y realizar una hidrólisis enzimática durante un tiempo de entre 1 y 24 h; y
25 g) determinar la actividad iDPP-IV y seleccionar un hidrolizado con una actividad iDPP-IV superior al 80%.

22.- El método según la reivindicación 21, donde la etapa b) se lleva a cabo a pH 3.

30 23.- El método según la reivindicación 21 ó 22, donde la etapa c) se lleva a cabo a una temperatura de 50-100°C.

24.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 21 a 23, donde la etapa c) se lleva a cabo durante entre 70-100 minutos.

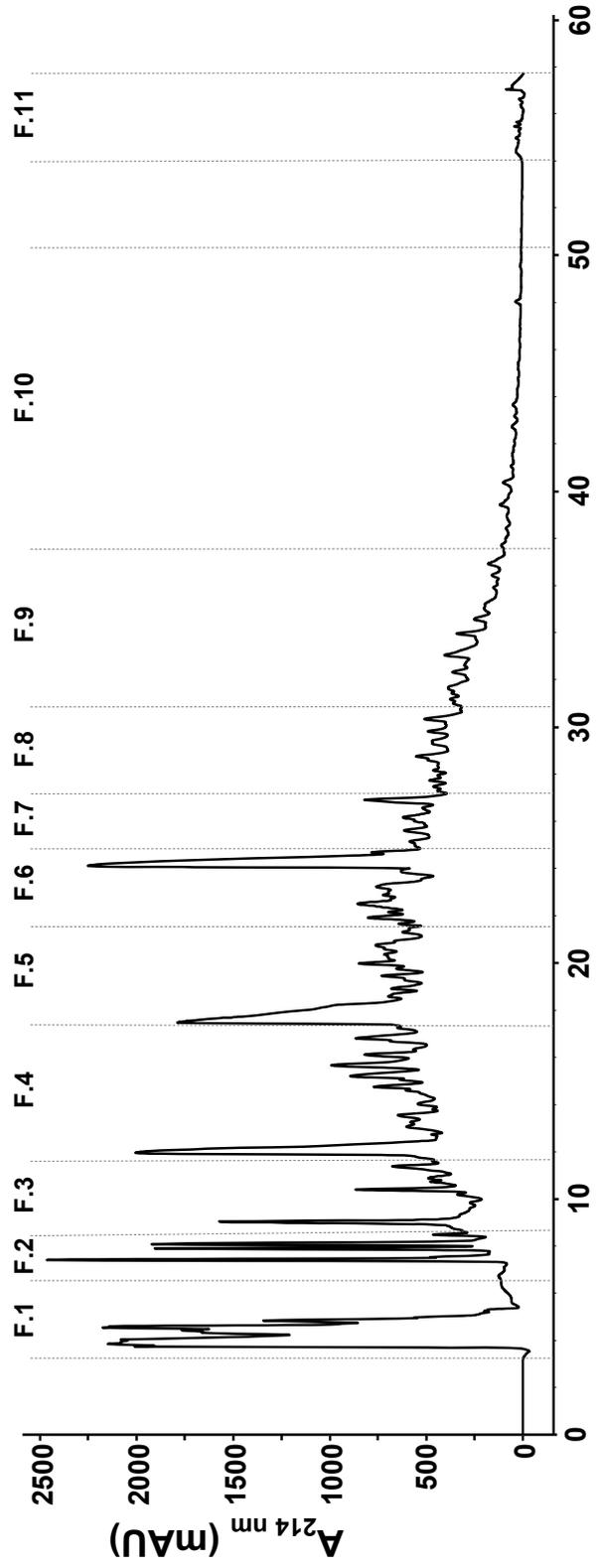
35 25.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 21 a 24, donde la temperatura

de la etapa d) es de entre 25°C y 50°C

26.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 21 a 25, donde en la etapa f) el enzima utilizado es:

- 5 - enzimas proteolíticas de *Bacillus licheniformis* y *Bacillus amyloliquefaciens* identificadas como E.C. 3.4.21.62 y 3.4.24.28, o
- una serinproteasa de *Bacillus licheniformis* identificada como E.C. 3.4.21.62.

10 27.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 21 a 26, que comprende una etapa adicional, etapa h), en la que se deseca el hidrolizado de la etapa g).



Tiempo de retención (min)

FIG. 1

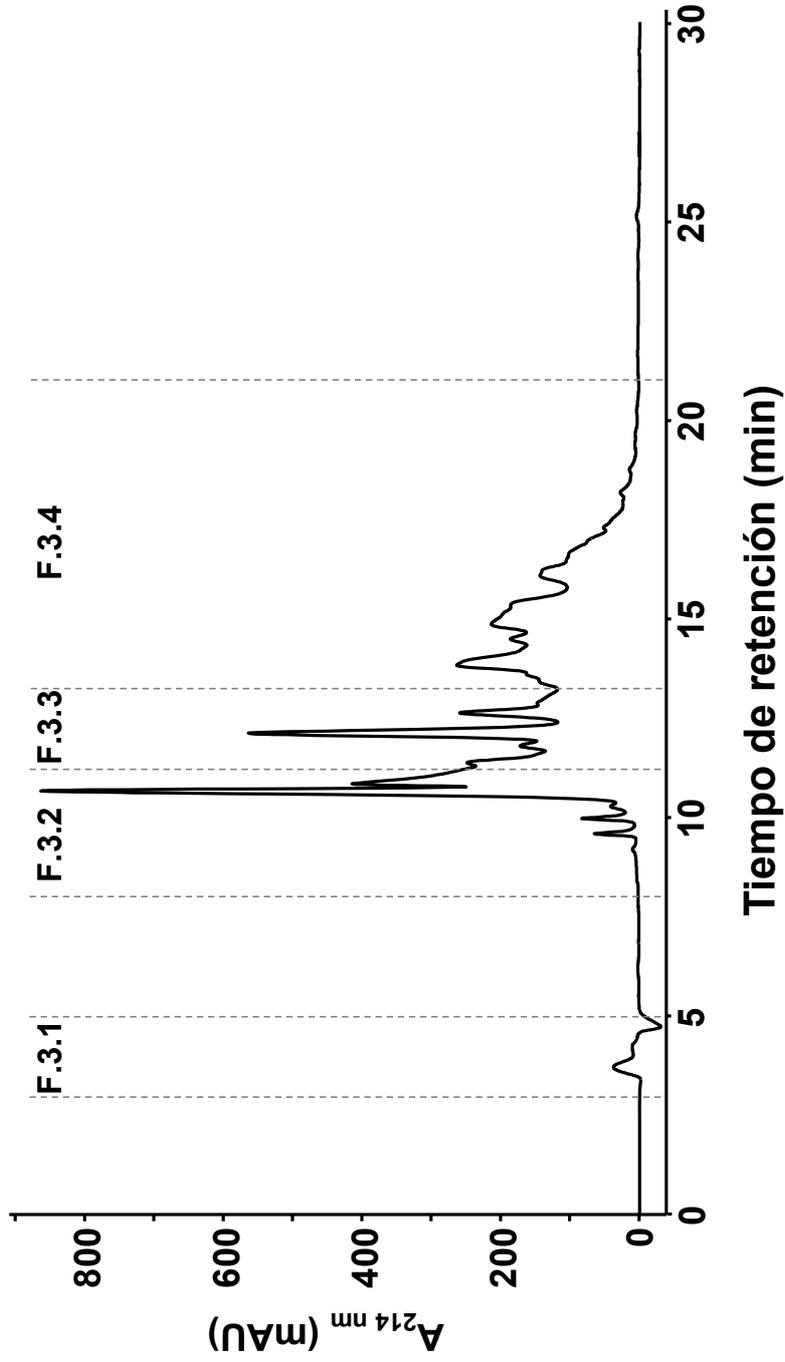


Fig. 2A

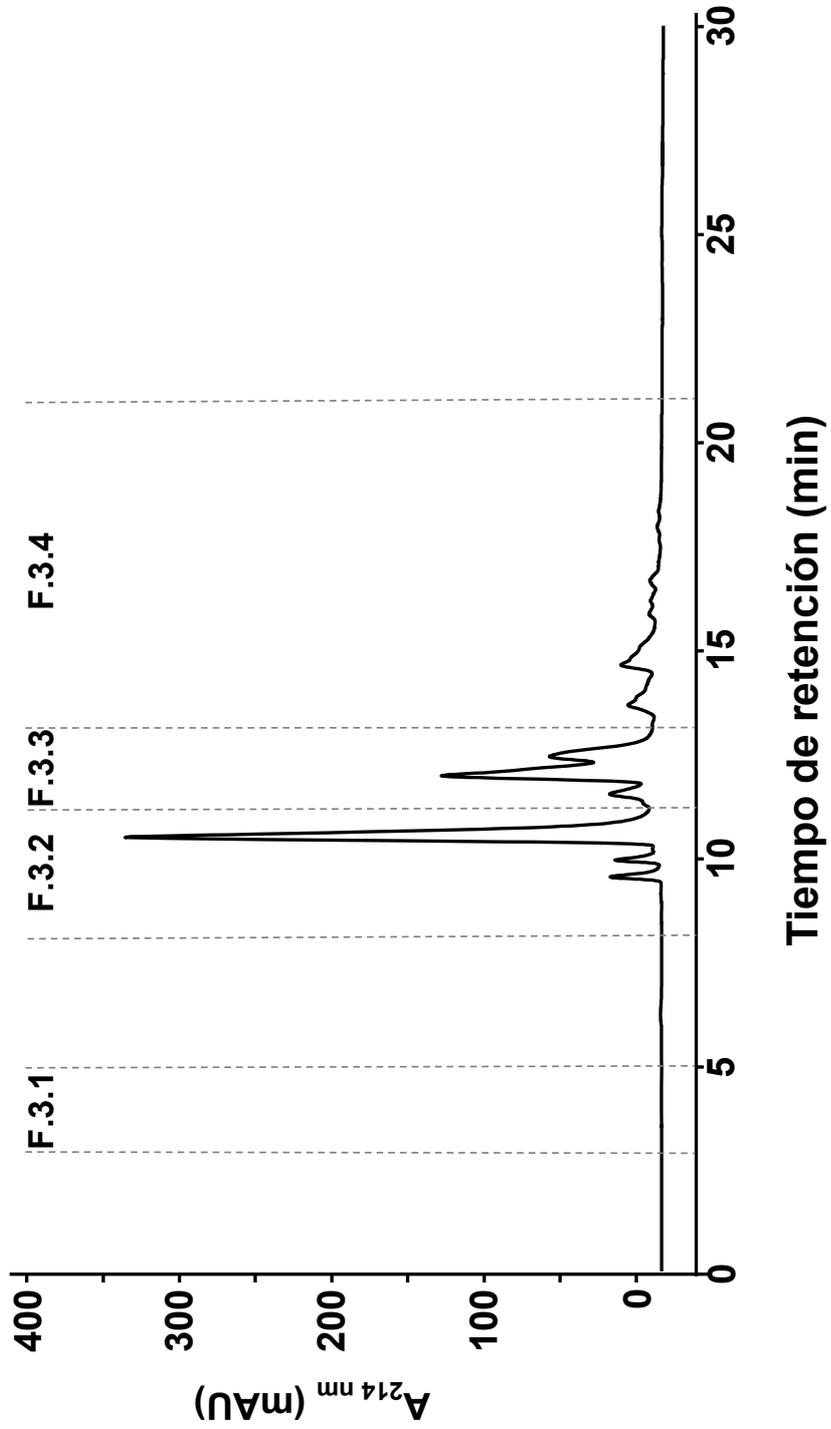
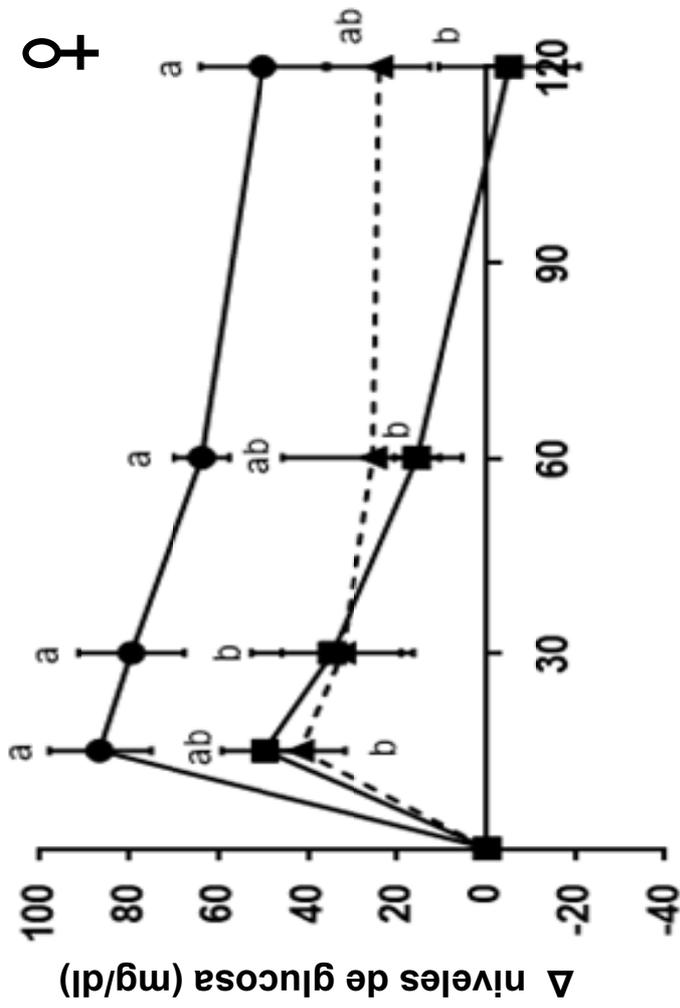


Fig. 2B



Tiempo de post-administración (min)

FIG. 3A

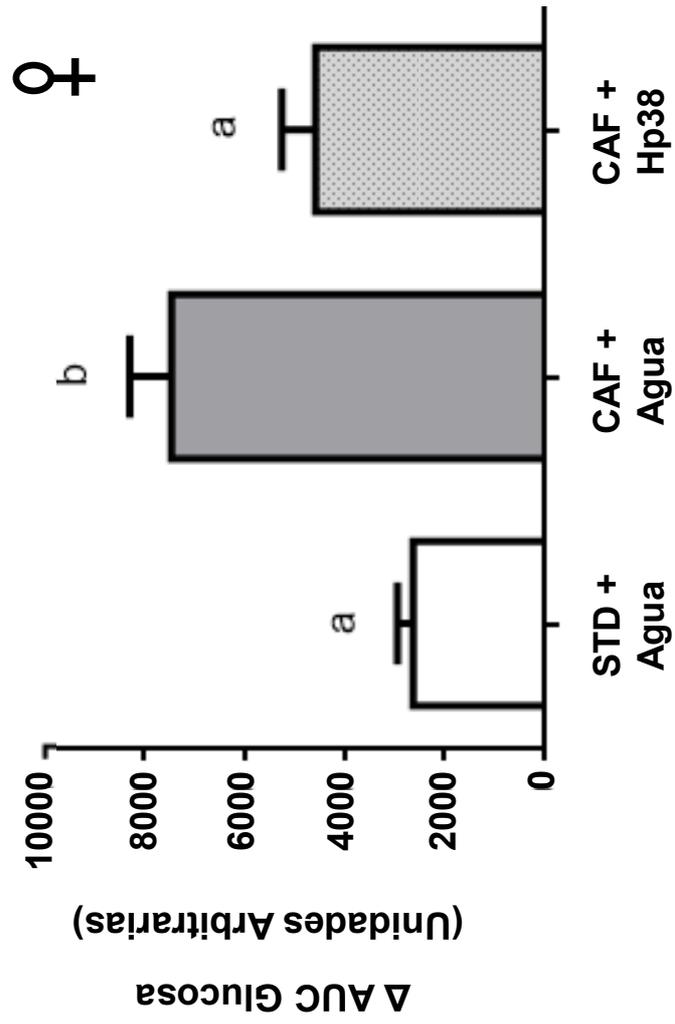


FIG. 3B

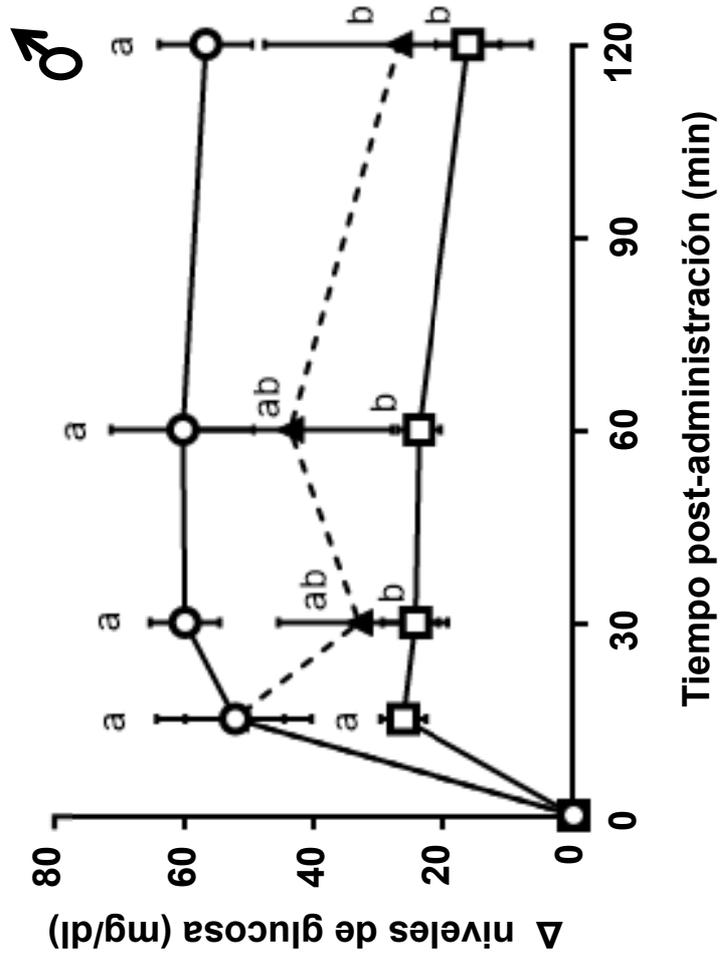


FIG. 4A

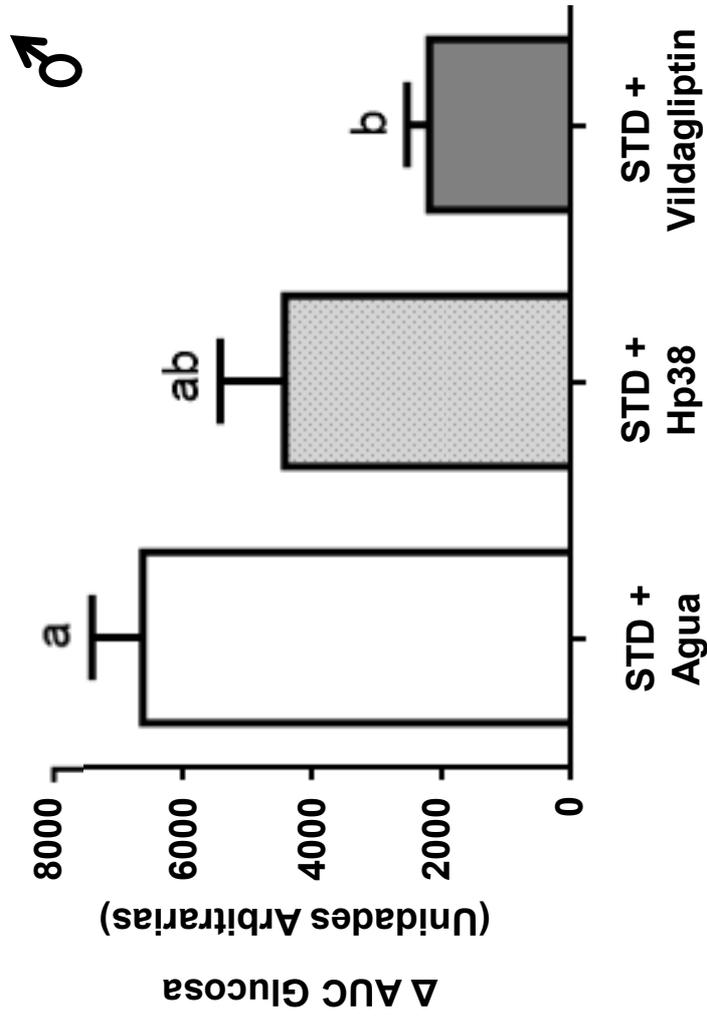


FIG. 4B

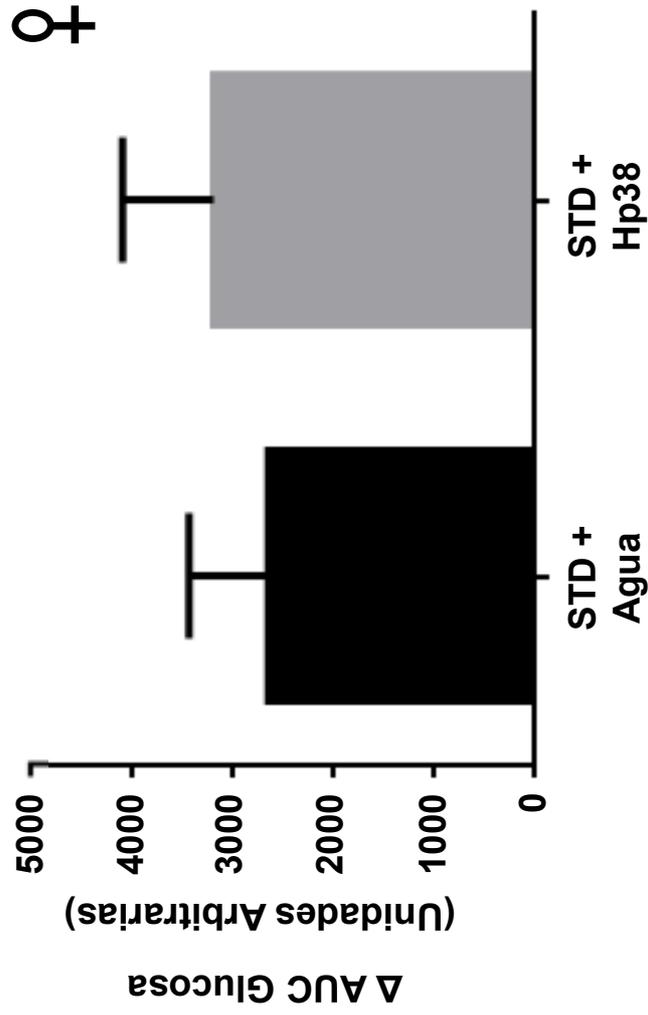


FIG. 5

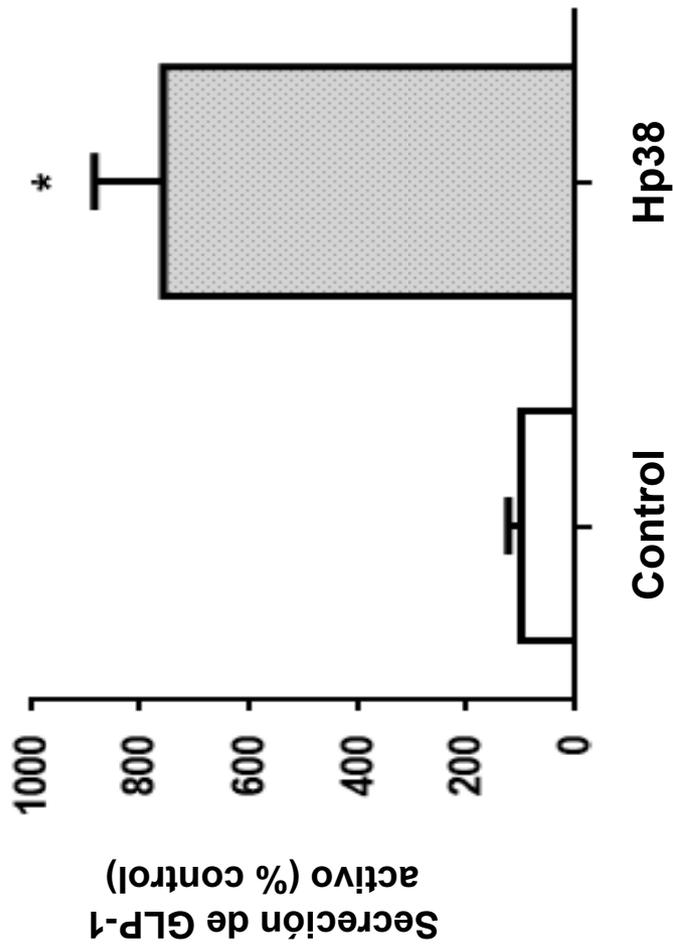


FIG. 6A

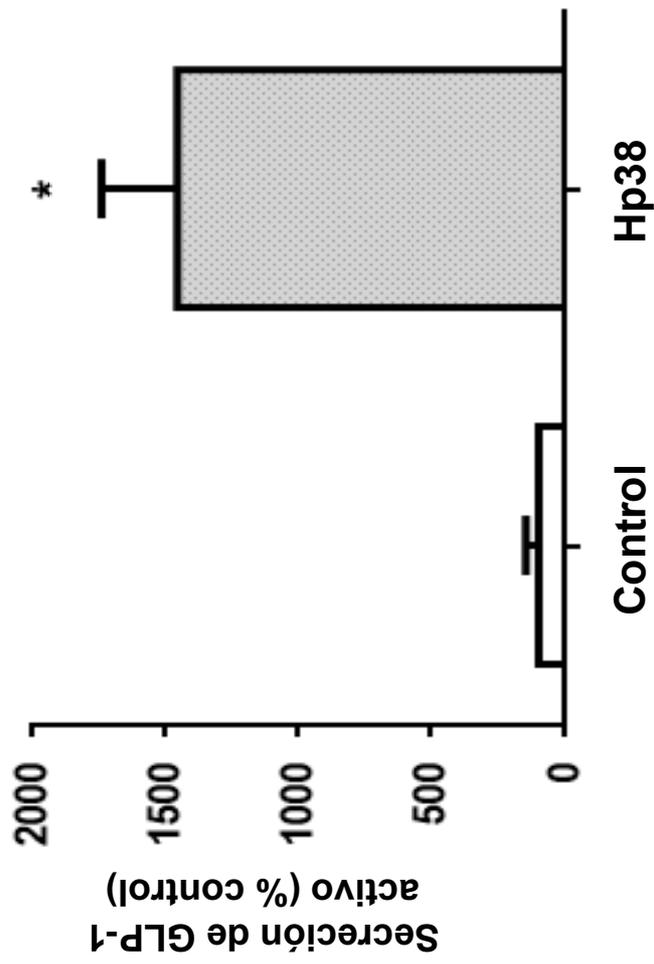


FIG. 6B



- ②① N.º solicitud: 201731065
 ②② Fecha de presentación de la solicitud: 04.09.2017
 ③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	US 2014309401 A1 (HAYASHIDA OSAMU et al.) 16/10/2014, ver resumen y párrafos [0067]-[0072]	1-27
A	WO 2013125622 A1 (MORINAGA MILK INDUSTRY CO LTD) 29/08/2013, ver resumen	1-27
A	COSTANTE ROBERTO et al. "DPP-4 inhibitors: a patent review (2012 - 2014)". Expert opinion on therapeutic patents England Feb 2015. , 31/01/2015, Vol. 25, Nº 2, Páginas 209 - 236, ISSN 1744-7674 (Electronic), <DOI: doi:10.1517/13543776.2014.991309 pubmed:25482888>. ver apartado 4	1-27
A	ES 2606954 A1 (UNIV ROVIRA I VIRGILI) 28/03/2017, ver ejemplos	1-27
A	WO 2008021290 A2 (HOMESTEAD CLINICAL CORP et al.) 21/02/2008, SEQ ID NO: 46197, 46209, 42101 y 46559	1-27
A	EP 2252729 A1 (SIU MICHAEL K W RALHAN RANJU et al.) 24/11/2010, SEQ ID NO: 368, 206 y 243	1-27

Categoría de los documentos citados

- X: de particular relevancia
 Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
 A: refleja el estado de la técnica

- O: referido a divulgación no escrita
 P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
 E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
24.04.2018

Examinador
M. d. García Coca

Página
1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C07K1/12 (2006.01)
C07K7/06 (2006.01)
A61K38/01 (2006.01)
A61K38/08 (2006.01)
A61P3/08 (2006.01)
A61P3/10 (2006.01)
A61P19/02 (2006.01)
A61P19/10 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07K, A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, EMBASE, BIOSIS, MEDLINE, XPESP, EMBL-EBI, bases de datos STN y bases de datos de texto completo